



Les vecteurs AAV recombinants : un nouvel outil de vaccination contre les Hénipavirus

Aurélie Ploquin

► To cite this version:

Aurélie Ploquin. Les vecteurs AAV recombinants : un nouvel outil de vaccination contre les Hénipavirus. Immunologie. Ecole normale supérieure de lyon - ENS LYON, 2012. Français. NNT : 2012ENSL0739 . tel-00756311

HAL Id: tel-00756311

<https://theses.hal.science/tel-00756311>

Submitted on 22 Nov 2012

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE

En vue de l'obtention du grade de
Docteur de l'École Normale Supérieure de Lyon – Université de Lyon
Spécialité : Science de la vie

Laboratoire de Virologie Humaine INSERM U758
École Doctorale de Biologie Moléculaire, Intégrative et Cellulaire

Présentée et soutenue publiquement le 20 septembre 2012
par

Aurélie PLOQUIN

Les vecteurs AAV recombinants : un nouvel outil de vaccination contre les Hénipavirus

Directrice de Thèse :
Dr Anna SALVETTI

Après avis de : Dr Karim BENIHOUD
Dr Carole MASURIER

Devant la commission d'examen formée de :

Dr Karim BENIHOUD, Rapporteur
Pr Renaud MAHIEUX, Examineur
Dr Carole MASURIER, Rapportrice
Dr Glaucia PARANHOS-BACCALA, Examinatrice
Dr Anna SALVETTI, Directrice de thèse

REMERCIEMENTS

Anna, merci de m'avoir donné l'opportunité de réaliser une thèse sur un sujet qui me tenait vraiment à cœur, la vaccination. Je te remercie pour la liberté que tu m'as donnée, ta disponibilité et la confiance que tu m'as accordées pendant ces 5 années passées à tes côtés. J'ai beaucoup appris et c'est grâce à toi que je suis autonome aujourd'hui.

Je tiens à remercier la Délégation Générale de l'Armement (DGA) pour m'avoir financée pendant 3 ans ainsi que la Fondation pour la Recherche Médicale (FRM) pour m'avoir fourni le financement nécessaire à l'aboutissement de ce travail de thèse.

Je souhaite également remercier mes rapporteurs, Karim Benihoud et Carole Masurier, pour leurs corrections et remarques très constructives, ainsi que tous les membres de mon jury pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

- - -

Un grand merci à Nathalie, ma première chef, qui m'a tout appris sur la Bio Mol et sur la fonction multi-tâche. Tu m'as soutenue pendant de nombreuses années et tu m'as donné de bons coups de fouet quand c'était nécessaire. Toi, qui m'as convaincue de venir dans ce laboratoire, Merci !!

Mes sincères remerciements à Armel pour m'avoir supportée pendant 3 ans, tu m'as toujours éblouie par tes connaissances et ta culture, merci pour tous les bons moments passés avec toi, et maintenant je comprends mieux beaucoup de choses...

Un gros clin d'œil à Vanessa avec qui j'ai démarré ce projet et avec qui je le termine même si nous ne sommes plus dans la même équipe !

À ma Delphine, un grand merci pour avoir fait un bout de chemin avec moi, ton amitié, tes conseils, ton soutien, nos sessions restaurants et tes récits de voyage ont été très importants pour moi ! Je n'oublierais jamais le fameux concert de M.F. !

Nelly, ma biche, voisine de boulot et d'appartement, nous avons partagé beaucoup de choses ensemble, merci pour nos fous rires, nos discussions, tes gâteaux et tout le reste, merci pour tes coups de mains avec mes souris, mes aliquots et mes coups de stress. AAV Forever !

Yo Manu, Merci pour m'avoir empêchée à plusieurs reprises de partir dans tous les sens, ta compagnie a été très agréable et je te remercie pour tout ce que l'on a partagé, tes conseils, nos sessions animaleries, nos petits trajets matinaux dans Lyon, nos pizzas et nos bonbons.

Mon petit, Ma Véro, je n'ai de mots pour te dire à quel point je te remercie pour TOUT ce que tu m'as apporté tant sur le plan professionnel que personnel, tu as été une seconde maman pour moi. Tu as changé ma vision de la culture cellulaire et appris les bases de la cytométrie. « Les cellules sont vivantes, il faut les aimer » cette phrase restera gravée !

Remerciements

Simon.... Simonade !!! Tu m'as bien fait rire, dont ma préférée restera « un western blette », « S.H comme centre hospitalier » ou encore prendre de la soude à main nue. Merci pour tous les moments que l'on a passés ensemble, même les moins drôles ...

Et enfin à Rachel, merci pour ta présence au quotidien, nos discussions et, nos rires et délires. Maintenant, je te passe le flambeau, je te souhaite la réussite et une excellente fin de thèse. Avec tous mes encouragements.

Merci également aux personnes qui ont séjourné dans l'équipe AAV, et notamment Cindy et Florent, dont je regrette qu'ils ne soient pas restés plus longtemps !

- - -

Un Immense Merci à mes piliers, Toi Julien, mon Chouchou et Toi Jocelyn, sans qui j'aurais fait bien des conneries. Vous m'avez apporté énormément de soutien, de réconfort, de conseil, de bons moments de fou rire, de joie, de motivation et de force. Le reste, je le garde pour moi. Un énorme bisou à vous 2, qui avez toujours été là pour moi, dans n'importe quelle situation et à n'importe quelle heure ! Spéciale dédicace à Chouchou avec qui j'ai fait énormément de chemin, merci pour ta confiance et merci pour tout ☺.

Merci à ma Steph, pour ta joie de vivre, ta motivation à toute épreuve, nos chansons et nos séances ciné « Eveuuu » !

Merci à ma Chagasse préférée, Alexa pour tous ces moments intimes dans les couloirs de l'ENS, tu m'as bien fait rire !

- - -

J'adresse également mes sincères remerciements à mes collaborateurs et aux personnes qui m'ont aidé à développer ce projet. Merci à Branka Horvat pour cette collaboration enrichissante. Un grand Merci à Judit, pour tes conseils, tes encouragements et ta disponibilité ! À Christelle, pour ton aide sur les ELISA et à Dimitri. À Cyrille pour ton aide avec les expériences au P4 et nos discussions !

Merci également à toutes les équipes de l'U758, l'équipe de FL.Cosset chez qui nous avons travaillé pendant quelques mois et avec qui j'ai gardé de très bon contacts ; à l'équipe EBV, merci d'avoir partagé votre pièce culture avec nous pendant 2 ans, remerciement spécial à Fabrice que j'ai beaucoup apprécié. Merci à l'équipe de Madeleine DucDodon et plus particulièrement à Mélanie qui a été mon inspiration et l'objectif à atteindre, toujours à faire plein de choses en même temps tout en gardant le sourire et la bonne humeur, un grand merci pour tous tes conseils ! L'équipe du LR avec notamment Andréa le chef, Greg, Stephanie, Xhuan-Ni, Kevin... merci pour votre soutien et votre aide. Merci également à l'équipe des OR et notamment Seb (et Sara) pour tous tes conseils et nos moments de rigolades. Enfin merci à l'équipe des TEV pour leur gentillesse et qui m'ont souvent vu faire des allers-retours dans leur couloir !

Un grand merci à Nathalie, une secrétaire admirable tant par sa gentillesse que par son efficacité et à Rahnia qui m'a fait découvrir le monde de la laverie.

Je tiens à remercier tout particulièrement l'équipe du laboratoire P4 sans qui ce travail n'aurait pas pu aboutir et notamment, Frédéric Jacquot (Fred) pour nos discussions scientifiques, ta disponibilité, ta compréhension et ta fameuse visite guidée du P4 !

Merci également aux plateaux techniques de l'IFR128 pour leur aide et leur conseil.

Au PBES : Jean-François Henry qui a pris soin de mes petites bêtes et qui m'a beaucoup appris, Marie Teixeira et Jean-Louis Thoumas que j'ai dérangé à de nombreuses reprises de peur qu'une de mes précieuses souris ne décède subitement.

A l'IBCP : Annie Chaboud, l'experte en protéine qui m'a énormément aidé dans le lancement de mon projet et m'a permis de voir les protéines autrement ! Isabelle Grosjean pour son aide dans la production des hybridomes et ses conseils.

Merci également au Centre de Bioexpérimentation VALBEX pour avoir fait les immunisations chez le hamster, merci à Alain Dorier qui m'a appris beaucoup de choses sur les animaux et leur manipulation et Virginie David pour son efficacité et sa gentillesse.

Et enfin Un grand merci à tous ceux que j'ai oubliés !

Ces remerciements ne seraient pas complets sans remercier la famille Ploquin. Mes parents qui m'ont fait confiance et m'ont permis de faire des études dans de très bonnes conditions, même si ça n'a pas toujours été facile pour eux. Vous m'avez fait confiance et vous m'avez permis de réaliser ma passion, sans vous, je ne serais pas là aujourd'hui. A mon frère pour nos nombreuses parties de S2 relaxantes et à ma belle-sœur pour sa gentillesse et sa bonne humeur. Merci à vous tous pour votre aide et votre soutien. A mes grands parents d'Arcachon qui ne sont plus là pour voir la fin de ce travail, vous m'avez toujours poussé à aller plus loin et vous m'avez énormément apporté. A mes grands parents Cancalais, un grand merci pour votre soutien.

Un grand merci à ma deuxième famille, à tous mes amis pour leur soutien, leur encouragement et leur présence durant ces années qui n'ont pas été toujours faciles. Malgré le fait que je n'ai pas été très présente pour vous, vous avez toujours été là pour moi donc tout simplement MERCI :

De l'ENS : Audrey, Claire, Fayçal, Nico, Mélanie, Cécile, Ludo, Gauthier, la petite Margaux et les Biogeek

De la FAC de Grenoble: Matthieu alias le Breton

Du lycée : Ben, Julien, Christina, Typhaine, Cécilia, le petit Maxime et les autres

Et pour finir, une petite pensée à Mes amis les bêtes, sans qui cette thèse n'aurait pas pu aboutir ...

RÉSUMÉ

Les vecteurs AAV recombinants : un nouvel outil de vaccination contre les Hénipavirus

Les virus Hendra (HeV) et Nipah (NiV) sont des virus émergents appartenant à la famille des Paramyxovirus et au genre des Hénipavirus. Chaque année, ils sont responsables de nombreuses épidémies touchant plusieurs espèces animales dont les hommes, avec une forte morbidité et mortalité. À ce jour, aucun vaccin ni traitement ne sont commercialisés. Ce projet porte sur le développement d'un vaccin génétique pour lutter contre une infection par les Hénipavirus. La stratégie suivie, repose sur l'injection *in vivo* de vecteurs recombinants dérivés du virus Adéno-Associé (AAVr) codant pour la glycoprotéine d'enveloppe G du virus NiV. Une première expérience réalisée chez la souris, a montré qu'une seule injection de vecteurs AAVr par voie IM permet le développement d'une réponse humorale contre la protéine G, forte et stable dans le temps. Afin de tester le pouvoir protecteur de ce vaccin, des hamsters ont été infectés par les Hénipavirus, compte tenu de leur grande sensibilité à ces infections. L'injection de vecteurs AAVr chez ces animaux a permis de protéger 100 % des animaux infectés par le virus NiV et 50 % des animaux infectés par le virus HeV. Cette étude apporte une nouvelle approche de vaccination et de nouvelles perspectives concernant l'utilisation des vecteurs AAVr pour lutter contre des infections virales émergentes.

Mots clés : Hénipavirus, vaccination, vecteur AAV, anticorps neutralisants, glycoprotéine G

ABSTRACT

Recombinant AAV vectors: a new vaccination tool against Henipaviruses

Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are closely related, recently-emerged Paramyxoviruses, capable of causing considerable morbidity and mortality in several mammalian species, including humans. Commercially available Henipavirus-specific vaccines are still unavailable and development of novel antiviral strategies to prevent this lethal infection is highly desirable. Here we describe the development of Adeno-Associated Virus (AAV) vaccines expressing the NiV G protein. Characterization of these vaccines in mice demonstrated that a single intramuscular AAV injection was sufficient to induce a potent and long lasting antibody response. Translational studies in hamsters further showed that 100 % of vaccinated animals were protected against a lethal challenge with NiV. In addition, this vaccine induced a cross-neutralizing immune response able to protect 50 % of the animals against a challenge HeV. Altogether, this study presents a new vaccination approach which opens new perspectives toward the evaluation of AAV vectors as a vaccine against these emergent diseases.

Key words: Henipavirus, vaccination, AAV vectors, neutralising antibodies, G glycoprotein

This work was performed in/ Ce travail a été réalisé au sein du

Laboratoire de Virologie Humaine - INSERM U758

Equipe AAV et vecteurs AAV recombinants

46 Allée d'Italie

69364 Lyon cedex 07

FRANCE

De 2008 à 2012

TABLES DES MATIÈRES

REMERCIEMENTS.....	3
RÉSUMÉ	7
ABSTRACT.....	8
TABLES DES MATIÈRES.....	9
LISTE DES FIGURES.....	13
LISTE DES TABLEAUX.....	14
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	15
INTRODUCTION	17
1. GÉNÉRALITÉS SUR LA VACCINATION	19
1.1 LES DIFFÉRENTS VACCINS.....	20
1.1.1 Vaccin utilisant un agent infectieux inactivé	20
1.1.2 Vaccin utilisant un agent infectieux vivant atténué.....	21
1.1.3 Vaccin utilisant un agent infectieux vivant recombinant	22
1.1.4 Vaccin sous-unitaire	22
1.1.5 Vaccin à ADN ou ARN	22
1.1.6 Vaccin génétique	23
1.2 COMPOSANTES DE LA VACCINATION	23
1.2.1 La voie d'administration	23
1.2.2 Les adjuvants.....	25
1.2.3 Les multiples injections de vaccins.....	26
1.3 IMPORTANCE DE LA VACCINATION.....	26
2. LES VECTEURS VIRAUX	27
2.1 LES POXVIRUS	28
2.1.1 Le virus de la Vaccine.....	29
2.1.2 Le virus MVA	30
2.1.3 Le virus de la Vaccine atténué : NYVAC.....	32
2.1.4 Le Canarypox ou ALVAC.....	33
2.2 LE VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULAIRE	34
2.3 LE VIRUS DE L'ENCÉPHALITE ÉQUINE VÉNÉZUELIENNE.....	36
2.4 L'ADÉNOVIRUS	38
2.5 LES VECTEURS RETROVIRAUX ET LES PSEUDOPARTICULES RÉTROVIRALES.....	43
3. LE VIRUS ADÉNO-ASSOCIÉ.....	45
3.1 LE VIRUS	46
3.2 LES SÉROTYPES D'AAV	49
3.3 LES VECTEURS AAV RECOMBINANTS	53
3.3.1 Le « trans-splicing »	54
3.3.2 Les vecteurs AAVr double brin	55
3.3.3 Les vecteurs AAVr utilisant des capsides modifiées.....	56
3.3.4 Modification de la capside virale	57
3.3.4.1 Les capsides mosaïques.....	57

3.3.4.2 Les capsides chimériques	58
3.3.4.3 Les capsides couplées à un peptide	59
3.3.4.4 Les capsides couplées à une molécule chimique	60
3.4 UTILISATION DES VECTEURS AAVR EN THÉRAPIE GÉNIQUE	60
3.5 PROBLÈMES LIÉS À L'INJECTION DES VECTEURS AAVR.....	63
3.5.1 Risque d'intégration	63
3.5.2 Risque de transmission dans les gonades.....	64
3.5.3 Réponses immunitaires contre les vecteurs AAVr	65
3.5.3.1 Induction de réponses innées	66
3.5.3.2 Induction de réponses adaptatives	67
3.5.4 Risque de réponses immunitaires contre le produit du transgène.....	68
3.6 POTENTIEL DE L'AAV EN TANT QUE VECTEUR VACCINAL.....	70
3.6.1 Réponses obtenues après une primo-injection	70
3.6.2 Effet de la voie d'injection et de la dose de vecteurs.....	71
3.6.3 Effet des différents sérotypes d'AAV	72
3.6.4 Comparaison avec d'autres modes de vaccination et effets d'adjuvants	73
3.6.5 Effet d'un rappel sur la réponse humorale induite par l'AAV.....	74
3.6.6 Effet d'un rappel sur la réponse cellulaire induite par l'AAV	74
3.6.7 Vaccination AAV et immunité protectrice anti-virale	75
4. LES HÉNIPAVIRUS.....	76
4.1 DÉCOUVERTE DES HÉNIPAVIRUS	76
4.1.1 Le virus Hendra.....	76
4.1.2 Le virus Nipah.....	77
4.2 RÉSERVOIR NATUREL ET ÉMERGENCE DES HÉNIPAVIRUS	79
4.2.1 La chauve-souris, un hôte pour les Hénipavirus	79
4.2.2 Emergence des Hénipavirus	80
4.3 ÉPIDÉMIES RECENSÉES, ÉPIDÉMILOGIE ET SYMPTÔMES	81
4.3.1 Épidémies.....	81
4.3.1.1 Épidémies du virus HeV.....	81
4.3.1.2 Épidémies du virus NiV.....	81
4.3.2 Epidémiologie.....	83
4.3.2.1 Transmission du virus HeV	83
4.3.2.2 L'épidémie Malaisienne du virus NiV	84
4.3.2.3 Les épidémies au Bangladesh et en Inde du NiV	85
4.3.3 Symptômes	86
4.3.3.1 Chez les hommes.....	86
4.3.3.2 Chez les animaux.....	88
4.4 CARACTÉRISTIQUES DES HÉNIPAVIRUS.....	88
4.4.1 Structure génomique	89
4.4.2 Hétérogénéité génétique	91
4.4.3 Cycle réplcatif <i>in vitro</i> et <i>in vivo</i>	92
4.4.4 Protéines virales et récepteurs cellulaires.....	93
4.4.4.1 La protéine F.....	93
4.4.4.2 La protéine G.....	95
4.4.4.3 Le récepteur cellulaire	95
4.4.5 Homologie entre les virus NiV et HeV	97

4.5 LES MODÈLES ANIMAUX	98
4.6 TRAITEMENTS DISPONIBLES CONTRE LES HÉNIPAVIRUS	101
4.6.1 Molécules chimiques	101
4.6.2 Peptides antiviraux.....	102
4.6.3 Immunisation passive.....	103
4.6.3.1 Anticorps murins	103
4.6.3.2 Anticorps humanisés	103
4.7 VACCINATION CONTRE LES HÉNIPAVIRUS	105
4.7.1 Vaccin à ADN.....	105
4.7.2 Vaccin sous unitaire utilisant la protéine G soluble	105
4.7.3 Les vaccins utilisant des VLP	108
4.7.4 Les vaccins génétiques utilisant les vecteurs viraux	108
RÉSULTATS	113
OBJECTIFS DE TRAVAIL.....	115
1. DÉVELOPPEMENT DES OUTILS.....	116
1.1 LES VECTEURS AAV-NiV.G	116
1.1.1 Construction du plasmide AAV codant pour la protéine G du virus Nipah	116
1.1.2 Validation des vecteurs AAV-NiV.G <i>in vitro</i>	117
1.2 DÉVELOPPEMENT D'UN TEST ELISA POUR LA DÉTECTION DES Ig ANTI-NiV G	120
1.2.1 Obtention d'une protéine NiV G soluble	120
1.2.1.1 Construction d'un plasmide codant la protéine G soluble.....	120
1.2.1.2 Production de la protéine G soluble	121
1.2.1.3 Purification et concentration de la protéine G soluble.....	124
1.2.1.4 Caractérisation de la protéine G soluble	126
1.2.2 Sélection des sérums servant de contrôle positif pour le test ELISA	127
1.2.3 Validation du test ELISA.....	128
1.2.4 Indications supplémentaires.....	130
1.3 DÉVELOPPEMENT DU TEST DE SÉRONEUTRALISATION.....	130
1.3.1 Développement des pseudoparticules VLP-NiV.....	131
1.3.2 Mise au point du test de séroneutralisation.....	134
1.3.3 Corrélation entre les deux tests de séroneutralisation	135
2. INJECTION DE VECTEURS AAV-NIV.G CHEZ DEUX MODÈLES ANIMAUX	138
2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE A.PLOQUIN ET AL.	138
2.1.1 Injection des vecteurs AAV-NiV.G chez le modèle murin.....	138
2.1.1.1 Suivi et caractérisation des réponses humorales chez la souris	138
2.1.1.2 Analyse de la persistance du vecteur AAV et de son expression	139
2.1.2 Immunisation des hamsters par le vecteur AAV8-NiV.G et validation de son pouvoir protecteur contre une épreuve virale.....	140
2.1.2.1 Immunisation des hamsters par le vecteur AAV8-NiV.G	140
2.1.2.2 Protection contre l'infection par le virus Nipah.....	141
2.1.2.3 Protection contre une épreuve virale par le virus Hendra	142
ARTICLE A.PLOQUIN ET AL.	145
2.2 ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES DANS LE MODÈLE SOURIS	180

2.2.1 Analyses des réponses anticorps neutralisantes dirigées contre les capsides d'AAV.....	180
2.2.2 Développement d'un vecteur Adénoviral codant pour la protéine NiV G	181
2.2.2.1 Construction d'un Adénovirus codant pour la protéine G du virus Nipah	182
2.2.2.2 Comparaison des réponses humorales induites par un AAV-NiV.G et un Ad-NiV.G	185
2.2.2.3 Etude de la persistance des vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G chez la souris .	187
2.2.3 Comparaison des réponses humorales induites par la protéine NiV G membranaire ou soluble	188
2.2.3.1 Développement des vecteurs AAV-NiV.Gs.....	188
2.2.3.2 Comparaison des réponses humorales induites par une protéine G membranaire ou soluble	190
2.3 ETUDES COMPLÉMENTAIRES DANS LE MODÈLE HAMSTER	191
2.3.1 Injection des vecteurs AAV chez le hamster	191
2.3.2 Analyse de l'effet protecteur du vaccin AAV-NiV.G vis-à-vis du virus Nipah	194
DISCUSSION.....	199
1. OUTILS DÉVELOPPÉS	201
1.1 DÉVELOPPEMENT DE LA PROTÉINE G SOLUBLE.....	201
1.2 VLP PSEUDOTYPÉES PAR LES PROTÉINES F ET G DU VIRUS NIPAH	202
2. IMMUNITÉ HUMORALE INDUITE PAR LES VECTEURS AAVR	204
2.1 SIMPLE ADMINISTRATION	204
2.1.1 Cinétique des réponses humorales	204
2.1.2 Effet de la voie d'administration	206
2.1.3 Effet de la dose.....	207
2.1.4 Effet des sérotypes d'AAVr	207
2.1.5 Effet de la localisation de l'antigène	211
2.2 EFFET D'UN RAPPEL SUR LA RÉPONSE HUMORALE	212
2.2.1 Réponse humorale	212
2.2.2 Persistance du vecteur dans le temps	214
3. VACCIN CONTRE LES HÉNIPAVIRUS	215
3.1 VACCIN CONTRE LE VIRUS NiV	215
3.2 VACCIN CONTRE LE VIRUS HeV.....	218
3.3 PERSPECTIVES.....	219
4. IMPLICATIONS DES RÉPONSES CELLULAIRES.....	220
ANNEXE 1 REVUE PUBLIÉE	221
ANNEXE 2 MATÉRIELS ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES.....	237
RÉFÉRENCES	247

LISTE DES FIGURES

Figure 1. L'hypothèse de la reine rouge	19
Figure 2. Techniques de vaccination.....	21
Figure 3. Anatomie de la peau et cellules effectrices	25
Figure 4. Causes de décès dans le monde	26
Figure 5. Schéma des génomes MVA, NYVAC et d'un MVA recombinant	31
Figure 6. Représentation schématique génomique du VSV et des vecteurs VSV recombinants .	35
Figure 7. Organisation génomique du VEE et des vecteurs VEE recombinants	36
Figure 8. Organisation du génome de l'Adénovirus et de ces vecteurs recombinants	39
Figure 9. Les Rétrovirus et les vecteurs rétroviraux	43
Figure 10. Le virus AAV et son génome	47
Figure 11. Cycle du virus AAV	48
Figure 12. Arbre Phylogénétique des différents sérotypes et variants d'AAV.....	50
Figure 13. Organes préférentiellement ciblés par les sérotypes d'AAV	51
Figure 14. Organisation génomique d'un vecteur AAV recombinant.....	54
Figure 15. La technique de « <i>trans-splicing</i> »	55
Figure 16. Les vecteurs AAV double brin	56
Figure 17. Techniques de modification de la capside virale des vecteurs AAVr	58
Figure 18. Présentation des antigènes codés par un vecteur AAVr et cross-présentation	69
Figure 19. Dissémination du virus Nipah en Malaisie de septembre 1998 à mai 1999	77
Figure 20. Chauves-souris frugivores Pteropus, hôtes naturels des virus Nipah et Hendra ...	79
Figure 21. Épidémies des virus HeV et NiV	82
Figure 22. Représentation de l'émergence et de l'épidémiologie du virus NiV en Malaisie ..	85
Figure 23. Évolution d'une infection humaine par le virus Nipah	87
Figure 24. Structure des virus HeV et NiV.....	90
Figure 25. Relations phylogénétiques entre des séquences génétiques du gène <i>N</i> de différentes souches du virus Nipah	92
Figure 26. Représentation schématique du processus de fusion engendré par la protéine F.....	94
Figure 27. Structure de la protéine G et de son interaction avec le récepteur EphrinB2.....	96
Figure 28. Représentation schématique des différentes protéines G solubles développées	106
Figure 29. Structure du plasmide AAV codant pour la protéine G du virus Nipah	117
Figure 30. Détection de la protéine G à la membrane cellulaire <i>in vitro</i>	118
Figure 31. Test de fonctionnalité des AAV-NiV.G <i>in vitro</i>	119
Figure 32. Structure de la protéine NiV.G sauvage et de la forme soluble.....	121
Figure 33. Production de la protéine G soluble	121
Figure 34. Optimisation de la production de G soluble	123
Figure 35. Purification de la protéine G soluble	124
Figure 36. Mise au point du test ELISA	129
Figure 37. Principe du test de séroneutralisation.....	132
Figure 38. Choix de la lignée cellulaire pour le test de séroneutralisation	134
Figure 39. Mise au point du test de séroneutralisation.....	135
Figure 40. Régression linéaire entre les tests de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV ou le virus NiV sauvage.....	137
Figure 41. Anticorps neutralisants anti-capside d'AAV et cross-neutralisation.....	181
Figure 42. Développement et caractérisation d'une protéine G Flag.....	183

Figure 43. Caractérisation du plasmide Adénoviral codant pour la protéine G-Flag.....	184
Figure 44. Comparaison des réponses humorales induites par les vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G.....	186
Figure 45. Persistance des vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G dans le temps	187
Figure 46. Fonctionnalité des vecteurs AAV-NiV.Gs	189
Figure 47. Injection des vecteurs AAV8-NiV.G et AAV8-NiV.Gs chez la souris	191
Figure 48. Immunisations successives chez le hamster	192
Figure 49. Distribution des réponses humorales chez le hamster.....	193
Figure 50. Schéma explicatif de l'épreuve virale et courbes de survie.....	195
Figure 51. Réponses immunitaires engendrées par la rencontre avec un antigène	210
Figure 52. Production des vecteurs AAV-NiV.G	241
Figures de l'article A.PLOQUIN <i>et al.</i>	168 à 179

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Pourcentage d'identité des capsides d'AAV entre les différents sérotypes	52
Tableau 2. Anticorps anti-capside d'AAV cross-neutralisants	53
Tableau 3. Résumé des essais cliniques majeurs utilisant des AAVr	62
Tableau 4. Épidémies du virus NiV de 1998 à 2012.....	83
Tableau 5. Comparaisons entre les séquences protéiques et génétiques des Hénipavirus... ..	98
Tableau 6. Fixation de la protéine Gs à son récepteur cellulaire EphrinB2	127
Tableau 7. Liste des hybridomes de souris anti-NiV G produits par V. Guillaume et I. Grosjean, et disponibles à la cellulothèque de la SFR Biosciences.	128
Tableau 8. Récapitulatif des résultats concernant l'épreuve virale par 1000 pfu de NiV.....	197
Tableaux de l'article A.PLOQUIN <i>et al.</i>	175 à 176

LISTE DES ABRÉVIATIONS

AAV : Virus Adéno-Associé
AAV-NiV.G : AAV recombinant codant pour la protéine G du virus Nipah
AcN : Anticorps Neutralisant
Ad : Adénovirus
ADN : Acide Désoxyribonucléique
ALVAC : Poxvirus du Canari
ARN : Acide Ribonucléique
ARNm : Acide Ribonucléique messenger
CD : Cellule Dendritique
Cellule T CD4+ : Cellule T possédant la glycoprotéine CD4 (Cluster de Différenciation 4)
Cellule T CD8+ : Cellule T possédant la glycoprotéine CD8 (Cluster de Différenciation 8)
CI : Concentration Inhibitrice
CMH : Complexe Majeur d’Histocompatibilité
CMV : Cytomégalo virus
CPA : Cellule Présentatrice d’Antigène
db : double brin
DO : Densité Optique
ELISA : *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*
EphrinB2 : ligand de type B2 des récepteurs Ephrin
GFP : *Green Fluorescent protein*
gp : particule de génome
Gs : protéine G soluble du virus Nipah
HBV : Virus de l’Hépatite B
HeV : Virus Hendra
HIV : Virus de l’Immunodéficience Humaine
HPV : Papillomavirus Humain
HRP : *Horseradish Peroxidase*
ID : Intradermique
IF : Immunofluorescence
IFN : Interféron
IgG : Immunoglobuline de type G
IL : Interleukine
IM : Intramusculaire
IN : Intranasale
IP : Intraperitonéale
ITR : Répétition Terminale Inversée
JEV : Virus de l’Encéphalite Japonaise
kDa : kilo Dalton
LTC : Lymphocyte T Cytotoxique
MLV : Virus de la Leucémie Murine
MOI : Multiplicité d’Infection
mSEAP : Phosphatase Alkaline murine Sécrétée
MV : Virus de la Rougeole
MVA : Virus de la Vaccine Ankara Modifié

Ni-IDA : *Nickel-Iminodiacetic Acid*
Ni-NTA : *Nickel-NitriloTriacetic Acid*
NiV : Virus Nipah
NYVAC : souche du virus de la Vaccine isolé à Copenhague
pfu : *plaque forming unit*
pi : particule infectieuse
p.i : post-infection
qPCR : Réaction de Polymérisation en Chaîne quantitative en temps réel
RCA : Adénovirus Compétent pour la Réplication
RVFV : Virus responsable de la Fièvre de Vallée du Rift
sb : simple brin
sc : *self-complementary*
SC : Sous Cutanée
SIV : Virus de l'Immunodéficience Simienne
SRAS : Syndrome Respiratoire Aigu Sévère
SVF : Sérum de Vœu Fœtal
TCM : Cellule T Centrale Mémoire
TE : Cellule T Effectrice
TEM : Cellule T Mémoire Effectrice
Th1 ou **Th2** : Cellule T auxiliaire de type 1 ou 2
TLR : Récepteur de Type Toll
TNF : Facteur de Nécrose Tumorale
VEE : Virus de l'Encéphalite Équine Vénézuélienne
VLP : Pseudoparticule virale
VRP : *VEE Replicon Particle*
VSV : Virus de la Stomatite Vésiculaire
VV : Virus de la Vaccine
WB : *Western Blot*
WNV : Virus du Nil Occidental
wt : sauvage

PRÉCISION

Identité de séquence : pourcentage de résidus identiques dans un alignement de séquence, on parle d'homologie dans un cas particulier de similarité, lorsque l'on considère que deux séquences similaires dérivent d'un ancêtre commun.

INTRODUCTION

1. GÉNÉRALITÉS SUR LA VACCINATION

Le monde se transforme sans cesse, du fait de l'évolution des climats, la modification des écosystèmes, l'influence des activités humaines et de bien d'autres facteurs. Chaque jour, de nouvelles espèces de bactéries et de virus évoluent ou sont découvertes. Une hypothèse de biologie évolutive, proposée par Leigh Van Valen, mentionne que « l'évolution permanente d'une espèce est nécessaire pour maintenir son aptitude suite aux évolutions des espèces avec lesquelles elle co-évolue » (Valen, 1973). Ce concept peut être transposé à un passage du livre de Lewis Carroll, où les deux personnages, Alice et la Reine Rouge courent ensemble à vive allure sans que le décor ne change pour autant (Figure 1). Il est important de mentionner que l'évolution de l'écosystème a un impact également sur l'évolution des espèces, ainsi il s'agirait plutôt d'une course aux multiples participants. Même si nous sommes en constante évolution, nos prédispositions ne suffisent pas toujours pour gagner cette course et bien souvent des espèces disparaissent.



Figure 1. L'hypothèse de la reine rouge

Toutes les espèces évoluent afin d'acquérir de nouvelles caractéristiques dans le but de ne pas être dépassées par les agents pathogènes qui mutent rapidement. Les espèces qui ne parviennent pas à suivre cette évolution disparaissent. Image extraite du livre de Lewis Carroll, « Alice au pays des merveilles - De l'autre côté du miroir », illustrateur John Tenniel.

En effet, lorsque de nouveaux virus ou de nouvelles bactéries sont découvertes, notre système immunitaire ne parvient pas toujours à lutter efficacement contre ces derniers, et ce, pour différentes raisons: 1) nos défenses immunitaires peuvent mettre trop de temps à se mettre en place, 2) nos réponses immunitaires peuvent ne pas être assez efficaces, 3) le pathogène peut contrecarrer le système de détection en restant « invisible » ou vu comme du soi et/ou muter très rapidement, prenant alors le système immunitaire de

vitesse. Il n'y a alors qu'une seule stratégie pour contrecarrer ces agents pathogènes, la vaccination.

Le principe de la vaccination repose sur l'utilisation d'un agent infectieux administré à un organisme, dans le but de forcer le système immunitaire de ce dernier à réagir contre cet agent étranger. Ainsi, lors d'une prochaine rencontre avec l'agent infectieux, l'organisme répondra de façon plus rapide et plus efficace. À ce jour, deux types de vaccination peuvent être distingués, une vaccination dite préventive, permettant à un organisme de mettre en place toutes les défenses immunitaires nécessaires avant la rencontre avec ledit pathogène, ou une vaccination thérapeutique permettant à une personne déjà infectée, d'aider son système immunitaire à réagir contre cette menace. Dans ce chapitre, seule la vaccination préventive anti-virale sera développée.

1.1 LES DIFFÉRENTS VACCINS

Une des premières vaccinations a consisté à administrer le pus d'une personne atteinte de la Variole à un enfant sain, dans le but de le vacciner contre cette infection virale (la Variole, Edouard Jenner, 1796).

De nos jours, de nombreux vaccins ont vu le jour utilisant des techniques plus contrôlées, de natures différentes et par de multiples voies d'administration (Figure 2) (Liu, 2010; Rappuoli, 2007; Small and Ertl, 2011).

1.1.1 Vaccin utilisant un agent infectieux inactivé

Une des premières formes de vaccination a consisté à injecter dans l'organisme l'agent pathogène sous une forme inactivée. Le virus est inactivé par divers procédés thermiques ou chimiques qui le rendent complètement inerte et incapable de se répliquer au sein de l'organisme, et n'induisant que peu de symptômes après administration.

Les vaccins contre la poliomyélite, le virus de l'Hépatite A, le virus de l'Hépatite B ou HBV (Hepatitis B virus), le virus de la grippe, le virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV) et bien d'autres encore, utilisent ce système de vaccination.

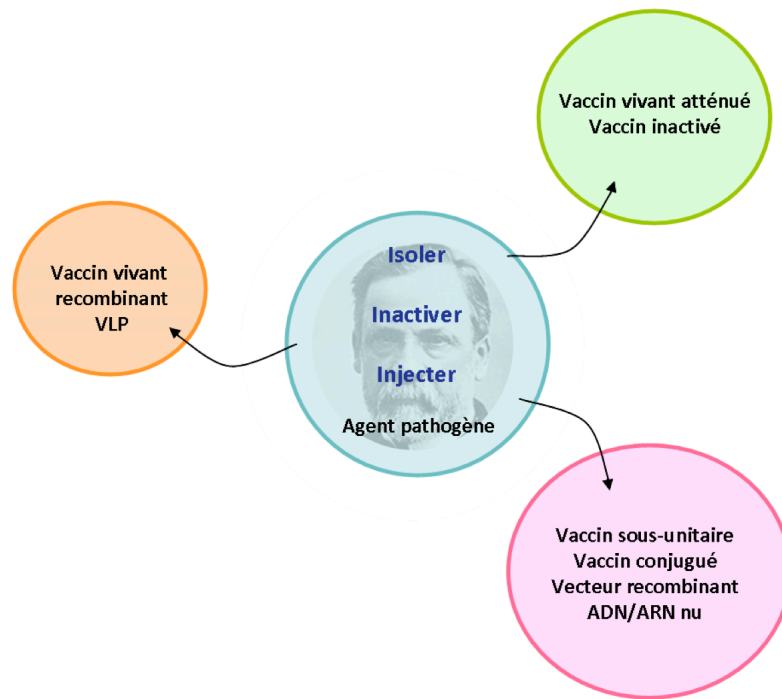


Figure 2. Techniques de vaccination

La plupart des vaccins développés jusqu'à présent, reposent sur les principes de Louis Pasteur utilisant la loi des 3 I : « Isoler, Inactiver et Injecter ». Depuis, d'autres techniques ont été expérimentées et approuvées. Schéma modifié de (Rappuoli, 2007).

1.1.2 Vaccin utilisant un agent infectieux vivant atténué

Les virus atténués sont des virus affaiblis de façon expérimentale qui, une fois injectés, permettent à un organisme de développer les symptômes de la maladie sans entraîner la mort de l'individu induite par le virus d'origine. Ils peuvent être atténués soit par traitement chimique, mais ce procédé est délicat car les propriétés immunogéniques ne doivent pas être endommagées ; soit par génie génétique, en supprimant le gène responsable de la virulence. Ce mode de vaccination permet de stimuler efficacement le système immunitaire. Cependant, dans certains cas, injecter un virus très dangereux, même atténué, représente un risque sanitaire trop élevé empêchant l'utilisation de cette méthode de vaccination. En effet, les virus atténués sont capables de se répliquer à bas bruit, et peuvent avoir un comportement différent de celui du virus non atténué ou encore, peuvent retrouver leur virulence. Ce phénomène a été observé lors de la vaccination contre la poliomyélite, induite par un virus à ARN du genre des *Enterovirus* et utilisé comme vaccin vivant atténué, qui après recombinaison avec d'autres virus a pu récupérer sa virulence (Kew *et al.*, 2002; Melnick, Benyesh-Melnick, and Brennan, 1959). Actuellement, cette technique est utilisée pour préparer des vaccins contre le virus de la Variole, le virus de la Rougeole ou MV (*Measles virus*), la rubéole, les oreillons, la tuberculose (vaccin BCG), la fièvre jaune, le virus responsable de la Fièvre de Vallée du Rift ou RVFV (*Rift Valley Fever virus*).

1.1.3 Vaccin utilisant un agent infectieux vivant recombinant

Ce système repose principalement sur le développement de pseudoparticules virales ou VLP (*virus-like particles*). La stratégie repose dans ce cas, sur l'injection dans l'organisme de la particule virale sans son contenu génétique. Ce système a déjà été utilisé récemment pour développer deux vaccins contre le Papillomavirus humain ou HPV : le Cervarix® (GlaxoSmithKline) et le Gardasil® (Merk). Ces VLP, mimant la structure de la particule virale sauvage, sont également en cours d'étude pour développer des vaccins contre le virus de l'Immunodéficience humaine ou HIV, le virus MV, les Filovirus et le virus de la grippe (Kang *et al.*, 2009; Roy and Noad, 2008; Young *et al.*, 2006).

1.1.4 Vaccin sous-unitaire

Pour de nombreux agents infectieux, des molécules immunogènes stimulant le système immunitaire ont été identifiées. Ceci permet d'utiliser pour la préparation du vaccin seulement une partie de l'agent infectieux, généralement des protéines. L'agent viral peut être produit et amplifié par génie génétique après expression de celle-ci dans différents systèmes (procaryote ou eucaryote). Après purification, l'antigène est injecté au patient. Ce type de vaccination permet généralement d'induire de fortes réponses humorales mais nécessite l'utilisation d'un adjuvant. Cependant, il est important de bien choisir l'antigène car un effet opposé à celui attendu pourrait être observé. C'est le cas de la protéine E6 du virus HPV qui a un effet oncogène sur les cellules ciblées *in vitro* (Sedman *et al.*, 1991). À ce jour, deux vaccins dirigés contre le virus HBV sont commercialisés : l'Engerix-B® (GlaxoSmithKline) en 1981 et le Recombivax HB® ou également appelé HB-VAX DNA® (Merck) en 1996. Ces deux vaccins utilisent comme antigène la protéine de surface du virus HBV (HBsAg) couplée à des adjuvants. Cette protéine a été produite à partir d'un système d'expression procaryote, les levures, puis a été extraite et purifiée.

1.1.5 Vaccin à ADN ou ARN

Cette technique de vaccination utilise des plasmides bactériens construits pour exprimer une protéine d'intérêt. Après administration du plasmide chez un individu, les cellules des tissus captent l'ADN étranger, produisent l'antigène au sein de ces cellules grâce à la machinerie cellulaire, et permettent une présentation de celui-ci par les mécanismes de détection du système immunitaire. Ce plasmide pouvant être injecté seul, est couramment appelé ADN « nu ». Afin d'augmenter son efficacité de transfection, cet ADN est couplé à des microparticules ou à des billes d'or. De nombreuses études pré-cliniques ont été réalisées avec succès, mais lors des essais cliniques chez l'homme, cette technique a échoué. À ce

jour, au moins quatre vaccins vétérinaires ont été commercialisés, dont deux contre des infections virales. En effet, en 2005, le vaccin West Nile-Innovator® (*Fort Dodge Animal Health*) a été développé chez le cheval pour lutter contre le virus du Nil Occidental ou WNV (*West Nile virus*) et le vaccin Apex-IHN® (*Novartis Animal Health*) a été mis au point pour lutter contre le virus de la nécrose hématopoïétique chez le saumon. Afin d'augmenter la puissance du vaccin à ADN, de nombreux outils et techniques sont en cours de développement (Liu, 2011; Saade and Petrovsky, 2012).

Concernant le vaccin à ARN, apparu plus récemment et encore en cours d'étude, il repose sur la transfection de cellules dendritiques (CD) par des ARN messagers (ARNm) *in vitro*, suivi d'une réinjection de ces cellules chez l'homme (Michiels *et al.*, 2005; Pascolo, 2006). Mais cette méthode de vaccination requiert encore le développement de nouvelles techniques d'administration, car l'ARN est instable et est vite dégradé s'il n'entre pas rapidement dans une cellule.

1.1.6 Vaccin génétique

Cette nouvelle génération de vaccins a recours à des vecteurs recombinants, provenant d'un virus peu ou non pathogène pour l'homme, modifié génétiquement pour accueillir l'ADN ou l'ARN d'un autre organisme (Dudek and Knipe, 2006). Les Poxvirus et les Adénovirus (Ad) sont les virus les plus connus et les plus utilisés pour développer ce type de vaccins. Cette partie sera détaillée dans le chapitre 2.

1.2 COMPOSANTES DE LA VACCINATION

Afin de mettre au point un système de vaccination efficace, il ne suffit pas de connaître la nature de l'antigène utilisé. En effet, de nombreux autres facteurs peuvent influencer les réponses immunitaires dirigées contre l'antigène ciblé. Plusieurs facteurs sont représentés brièvement ci-dessous.

1.2.1 La voie d'administration

Les vaccins peuvent être administrés par différentes voies d'injection, permettant de cibler différentes cellules ou régions de l'organisme. L'injection d'un vaccin peut être réalisée par voie intramusculaire (IM), intradermique (ID), trans-cutanée (TC), sous-cutanée (SC), orale, intranasale (IN) ou encore intrarectale (IR).

Les voies IM, ID et SC sont les voies majoritairement utilisées pour vacciner la population humaine contre de nombreux agents pathogènes.

L'injection par voie IM consiste à injecter le vaccin dans le muscle squelettique. L'activation du système immunitaire innée par les cellules musculaires n'est pas très bien décrite. Une étude récente a montré que les cellules musculaires expriment de nombreux récepteurs de type Toll ou TLR, qui sont les clefs de voute de la réponse immunitaire innée. En effet, leur activation engendre des réponses pro-inflammatoires avec production de cytokines, qui stimule la présentation de l'antigène aux cellules T et active les réponses immunitaires contre l'antigène. Les TLR2, TLR4, TLR5 et TLR9 ont été découverts dans le muscle squelettique à la surface de myotubes différenciés chez la souris (Marino *et al.*, 2011). En réponse à une inflammation, comme à l'introduction d'une aiguille dans le muscle d'un animal, les cellules musculaires expriment des molécules d'adhésion cellulaire ou CAM, des récepteurs de cytokines, et expriment des molécules co-stimulatrices. Grâce à ces dernières, les monocytes sont recrutés au site de l'inflammation. Dans des conditions physiologiques normales, les fibres musculaires matures n'expriment pas de molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type 2 (CMH-II). En revanche, en présence d'une inflammation, les antigènes leucocytaires humains ou HLA-DR (*Human leucocyte antigen*) sont exprimés à la surface des cellules musculaires. Ces molécules de types CMH-II constituent un ligand pour les récepteurs des cellules T (Marino *et al.*, 2011). C'est pourquoi, les myoblastes humains sont considérés comme des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) non-professionnelles. Cette voie d'injection est très courante, car elle induit très peu d'effets secondaires, et est très facilement et rapidement réalisable du fait de l'accessibilité du tissu musculaire (Zuckerman, 2000).

L'injection par voie ID s'effectue dans le derme, lieu où résident de nombreuses cellules immunitaires (Figure 3). Les cellules dendritiques dermales (CD Dermale) et des cellules dendritiques plasmacytoïdes (CDp) y sont présentes en grande quantité. Des lymphocytes T de différents sous-types, ainsi que des macrophages, résident également dans le derme.

Les cellules dendritiques fonctionnent comme des intermédiaires entre les réponses immunitaires innées et adaptatives. Dès la rencontre entre un antigène et les cellules dendritiques, de nombreuses cytokines sont produites et sécrétées dans le milieu extracellulaire, activant entre autre les cellules B du système immunitaire adaptatif, responsables de la production d'anticorps. La présence de ces cellules effectrices et la proximité des vaisseaux sanguins a prouvé, à de nombreuses reprises, l'efficacité de cette injection par voie ID pour induire des réponses immunitaires rapides contre un antigène. Ce mode d'injection s'avère aussi plus délicat à réaliser, et doit être plus précis, au risque

d'effectuer une injection SC. Le volume d'injection nécessaire est généralement beaucoup plus faible que pour une injection IM. C'est pourquoi, une injection d'une quantité moindre de vaccin suffit (Lambert and Laurent, 2008; Nestle *et al.*, 2009).

L'injection par voie SC s'effectue dans l'hypoderme, un tissu conjonctif très vascularisé (Figure 3). Très peu de cellules immunitaires sont présentes dans cette partie de la peau et les réponses immunitaires engendrées sont majoritairement plus lentes que par voie IM ou ID. Ceci est dû au délai requis pour acheminer l'antigène jusqu'aux cellules immunitaires. Ce type d'injection peut avoir certains effets indésirables, comme l'apparition d'abcès ou de granulomes (Zuckerman, 2000).

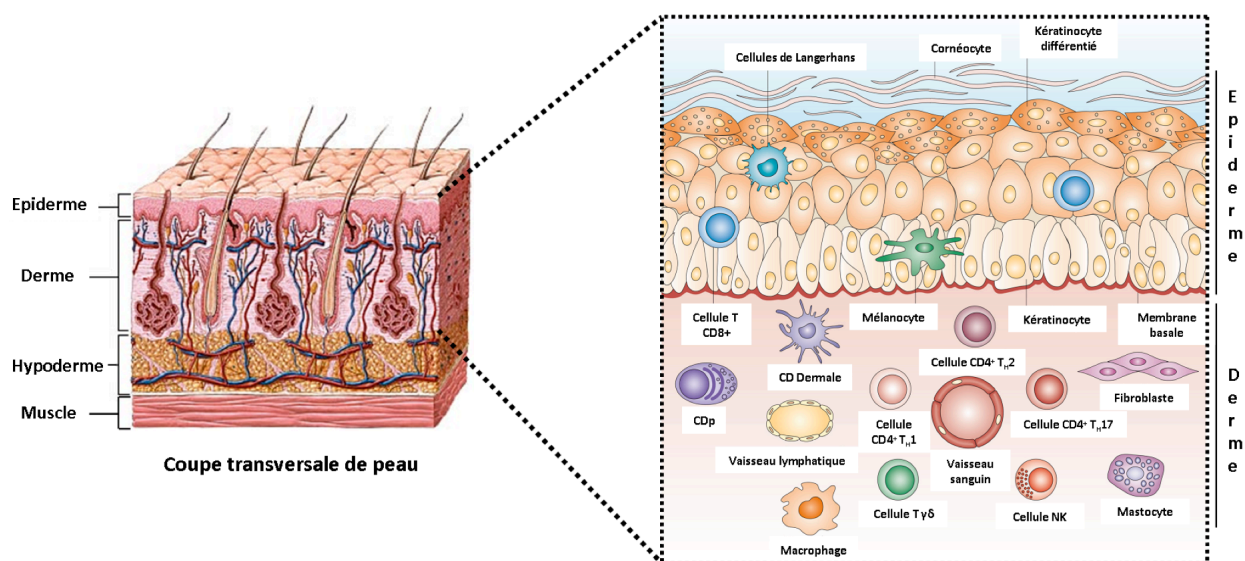


Figure 3. Anatomie de la peau et cellules effectrices

Schéma représentant une coupe transversale de la peau avec les différents niveaux. La partie droite du schéma montre un agrandissement de l'épiderme et du derme. L'épiderme, représentant la partie vitale de la peau, est composé de mélanocytes produisant la mélanine, et des cellules de Langerhans. Quelques cellules T CD8⁺ peuvent être présentes. Le derme est composé de collagène, de tissu élastique et de réticuline. Plusieurs cellules du système immunitaire peuvent être identifiées, comme les cellules dendritiques (CD) dont les CD dermales et les CD plasmacytoïdes (CDp), et des cellules de type T. L'injection par voie ID a lieu dans le derme, alors que l'injection SC est réalisée dans l'hypoderme. Schéma modifié de (Nestle *et al.*, 2009).

1.2.2 Les adjuvants

Les adjuvants sont utilisés afin de stimuler et d'augmenter la puissance des réponses immunitaires développées par une seule injection de vaccin. Ils sont ajoutés en complément du vaccin, uniquement si les réponses développées sont jugées insuffisantes ou peu protectrices, ou si un nombre trop important de rappels est nécessaire. Un adjuvant peut moduler la qualité des réponses développées, en stimulant davantage un sous-type de

cellules plutôt qu'un autre. Il permet également d'augmenter le maintien de la réponse immunitaire dans le temps ou encore, d'utiliser une quantité d'antigène plus faible. Les adjuvants les plus connus sont les sels d'aluminium, l'adjuvant de Freund, le lipopolysaccharide ou LPS, le MF59 (Novartis) et plus récemment les agonistes des TLR en cours d'études cliniques (Dekker, Gordon, and Klein, 2008; Rajput *et al.*, 2007).

1.2.3 Les multiples injections de vaccins

Une deuxième voire plusieurs injections peuvent également stimuler les réponses immunitaires. Un phénomène important est à signaler dans le cas de vaccins utilisant un vecteur pour exprimer ou véhiculer l'antigène viral : lors de la première injection de vaccin, une immunité contre le produit du transgène et contre le vecteur vaccinal utilisé se développe. Ainsi, généralement, les anticorps anti-vecteur présents après la première immunisation, peuvent neutraliser la deuxième injection de vaccin, ce qui induit une stimulation atténuée. En conséquence, l'utilisation d'un vaccin hétérologue se voit plus souvent privilégiée en seconde administration ce qui permet, d'une part, d'éviter sa neutralisation par le système immunitaire, et d'autre part, de stimuler d'autres types de réponses immunitaires que celle induite lors de la première injection.

1.3 IMPORTANCE DE LA VACCINATION

Sur les millions de décès survenant dans le monde chaque année, plus d'un quart est provoqué par des maladies infectieuses émergentes contre lesquelles la population n'est que peu ou pas protégée (Figure 4) (Morens, Folkers, and Fauci, 2004).

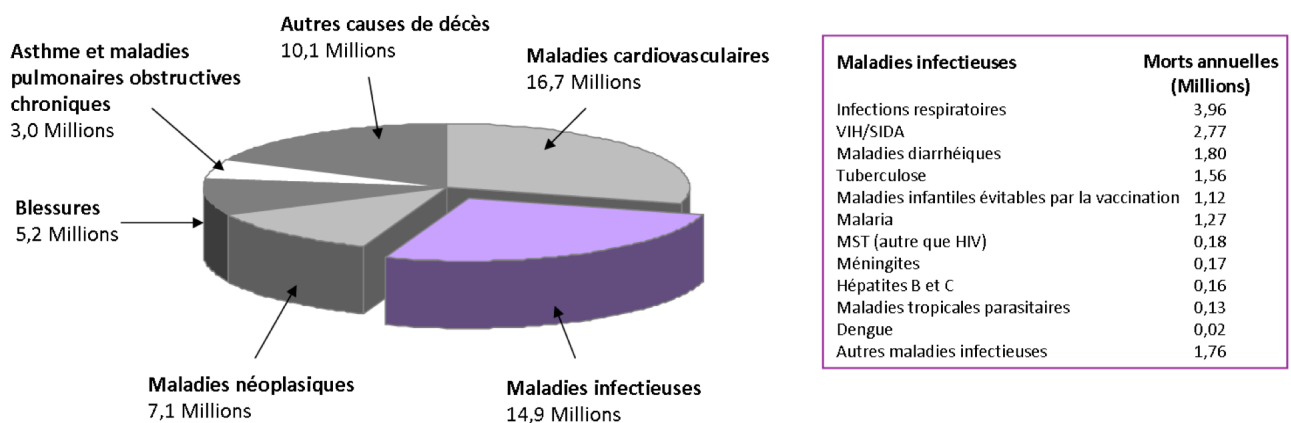


Figure 4. Causes de décès dans le monde

La part des décès annuels liés aux maladies infectieuses émergentes concerne environ une personne sur quatre dans le monde. Schéma modifié de (Morens, Folkers, and Fauci, 2004).

Concernant les maladies infectieuses émergentes, entre 1940 et 2004, 335 nouvelles maladies ont été diagnostiquées dont 25 % sont provoquées par des virus émergents. De plus, sur environ 200 virus infectant l'homme, seule une vaccination sur 15 d'entre eux a été réalisée jusqu'à présent (Jones *et al.*, 2008; Small and Ertl, 2011). La vaccination contre un nouvel agent pathogène s'avère très complexe, l'objectif étant d'induire des réponses immunitaires protégeant l'organisme contre le virus ciblé. Dans la majorité des vaccins utilisés de nos jours, une réponse humorale avec développement d'anticorps neutralisants (AcN) est suffisante pour protéger les organismes contre une infection virale ciblée. Ces vaccins sont dirigés contre des virus ayant peu de variabilité antigénique comme le virus MV, HBV ou encore HPV. Cependant, dans certaines maladies infectieuses telles que l'immunodéficience induite par le virus HIV, il semble qu'une réponse cellulaire soit nécessaire pour enrayer efficacement l'infection (Rappuoli, 2007).

Suivant la voie d'administration, le type de vaccin choisi et l'organisme ciblé, le système immunitaire ne répondra pas de la même façon. Il faut donc trouver pour chaque espèce animale, le ou les bons antigènes ainsi que la technique afin d'apporter ces antigènes au sein de l'organisme, par la voie d'injection appropriée, pour que la réponse immunitaire soit forte, rapide et efficace. Voici schématisés, toute la complexité et le développement nécessaire pour obtenir un vaccin efficace contre de nombreux pathogènes et capable d'agir sur de nombreuses espèces animales.

Dans la course à la vaccination, les vecteurs viraux occupent une part de plus en plus importante dans les essais de vaccinations réalisés en laboratoire ou en essais cliniques, entrepris contre de nombreux pathogènes viraux.

2. LES VECTEURS VIRAUX

Les vecteurs viraux sont issus des virus génétiquement modifiés dans le but d'insérer un gène d'intérêt codant pour des antigènes possédant un fort pouvoir immunogène. Ces vecteurs ont été employés dans des essais de thérapie génique et dans des essais de vaccination. Seul l'aspect vaccinal sera abordé dans cette partie.

Plusieurs facteurs sont indispensables pour faire d'un vecteur viral un outil idéal pour la vaccination. Il faut que: 1) ce vecteur soit facile à manipuler ; 2) qu'il puisse porter un gène de petite comme de grande taille ; 3) qu'il puisse permettre l'expression d'une protéine hétérologue fonctionnelle et en quantité suffisante ; 4) que sa production soit facile à mettre en œuvre ; et enfin 5) que ce vecteur recombinant n'induisse aucun effet secondaire lors de son injection dans un organisme. Dans la mesure du possible, il est idéal que ce vecteur puisse cibler un type de cellule en particulier ou un organe, et non l'organisme entier. Enfin,

d'un point de vue commercial, il faut également que la mise en œuvre d'un tel vaccin soit la moins onéreuse possible et que ce vaccin puisse être administré facilement à de nombreuses personnes (Liu, 2010).

De nombreux vecteurs viraux utilisés pour la vaccination ont démontré à la fois des aspects positifs comme des effets plutôt indésirables. Seule une partie de ces vecteurs viraux recombinants sera développée dans ce chapitre, afin de permettre la bonne compréhension de ce travail de thèse.

2.1 LES POXVIRUS

Les Poxvirus (ou encore virus à pustule), appartiennent à la famille des *Poxviridae* et possèdent de nombreuses caractéristiques pouvant être utilisées comme vecteur vaccinal. Leurs génomes à ADN double brin (db) de grande taille, de 150 kpb à 375 kpb pour certains virus Avipox, permettent l'insertion d'une séquence d'ADN étrangère pouvant aller jusqu'à 30 kpb (Perkus *et al.*, 1985).

Ces virus ont été les premiers à être utilisés pour vacciner la population humaine. L'exemple le plus célèbre est l'utilisation, par le scientifique Edouard Jenner au 18^{ème} siècle, du virus « *Cowpox* » pour vacciner contre le virus de la Variole (*variola* ou *Smallpox*). Par la suite, le virus de la Vaccine (*Vaccinia virus*), très proche génétiquement du *Cowpox*, découvert chez le cheval, a été privilégié pour cette vaccination car il induisait des effets secondaires plus légers que le *Cowpox* (Moss, 1996). Les virus de la Vaccine et du *Cowpox* ont d'ailleurs donné leur nom à cette nouvelle discipline scientifique, la « vaccine - ation », pour la différencier de la « variolisation » qui consistait à injecter de petites quantités de virus de la Variole. L'utilisation du virus de la Vaccine a permis l'éradication de la Variole pendant la période 1967-1980 mais de nombreux problèmes de santé publique sont ensuite apparus, comme la dissémination du virus chez les individus immunocompromis, des dermatites atopiques et des complications cardiaques (Fenner, 1989).

Pendant les années 1980-2000, de nombreux scientifiques ont cherché à améliorer la sécurité liée à l'utilisation de ce virus. Ainsi, les premiers Poxvirus recombinants ont été développés en 1982 aux Etats Unis par les équipes d'Enzo Paoletti et de Bernard Moss (Panicali and Paoletti, 1982).

Les Poxvirus recombinants permettent après une seule injection chez l'animal, l'induction de réponses humorales et cellulaires contre l'antigène exprimé et ce, chez de nombreuses espèces animales (Smith, Mackett, and Moss, 1983; Smith, Murphy, and Moss, 1983). De plus, ces vecteurs peuvent être administrés par différentes voies (Gherardi and

Esteban, 1999) et leur développement se révèle assez simple à réaliser et peu coûteux. Ces vecteurs recombinants peuvent être lyophilisés tout en restant très stables dans le temps, ce qui permet de s'affranchir de la chaîne de froid pour leur transport et leur conservation, et en augmente leur capacité de distribution dans des endroits difficiles d'accès (Pastoret and Vanderplasschen, 2003).

Une fois entrés dans la cellule hôte, les Poxvirus se répliquent entièrement dans le cytoplasme n'induisant aucune intégration de l'ADN dans le génome de la cellule hôte. La première phase d'infection des Poxvirus nécessite le relargage du génome viral, ainsi que de l'ARN polymérase dans le cytoplasme de la cellule. Par la suite, l'ARN polymérase transcrit des gènes précoces nécessaires à la production de protéines impliquées dans la réplication virale. En d'autres termes, ce virus ne détourne pas la machinerie cellulaire dans les premières phases d'infection. La production de ces protéines précoces est nécessaire et essentielle à la réplication virale ainsi qu'à l'expression de toutes les autres protéines virales. En conséquence, les Poxvirus sont considérés comme des virus non infectieux (Moss, 1996). Cependant, cette étape peut être perçue comme une étape limitante dans le cas des Poxvirus recombinants, à cause du délai requis pour l'expression des protéines précoces, la phase de réplication et l'expression de l'antigène d'intérêt. Du fait de cette caractéristique, les Poxvirus recombinants doivent obligatoirement avoir un ou plusieurs promoteurs provenant du virus sauvage afin de pouvoir exprimer la protéine d'intérêt, ainsi les promoteurs ne peuvent pas être remplacés par des promoteurs étrangers plus efficaces. Trois promoteurs du virus sauvage existent, à savoir ; les promoteurs précoces, intermédiaires et tardifs. Ces promoteurs ne sont pas activés au même moment de l'infection et ne produisent donc pas la protéine d'intérêt continuellement.

2.1.1 Le virus de la Vaccine

Comme mentionné précédemment, le virus de la Vaccine (VV) a été utilisé comme vaccin vivant atténué pour lutter contre le virus de la Variole, qui a été éradiqué en 1978. Ce vaccin commercialisé jusqu'en 2008 sous le nom de Dryvax® (Wyeth Laboratories) a été produit chez la vache et contient beaucoup de protéines contaminantes. Il est composé de 6 souches de virus, récoltées et cultivées sur des lésions de peau de vache infectée. Ce vaccin a été associé à de nombreux effets secondaires chez l'homme tels que des encéphalites, des conjonctivites et de nombreuses complications dermatologiques. Dans certains cas, une réplication du virus de la Vaccine a pu être observée au sein de l'individu vacciné, entraînant la dissémination du virus, et pouvant provoquer la mort de l'individu (Walsh and Dolin, 2011). De par la technique de production employée et des nombreux risques liés à son injection chez l'homme, le gouvernement américain a participé au développement d'un

nouveau vaccin contre le virus de la Variole. En 2008, une seconde génération de vaccin a été commercialisée, ACAM2000TM (Acambis), produit à partir d'une seule souche de virus, amplifiée par culture cellulaire et beaucoup plus propre que le vaccin Dryvax[®]. Malheureusement, après injection de ce nouveau vaccin, des effets secondaires similaires ou légèrement atténués ont pu être observés en comparaison avec le vaccin Dryvax[®] (Nalca and Zumbrun, 2010; Walsh and Dolin, 2011).

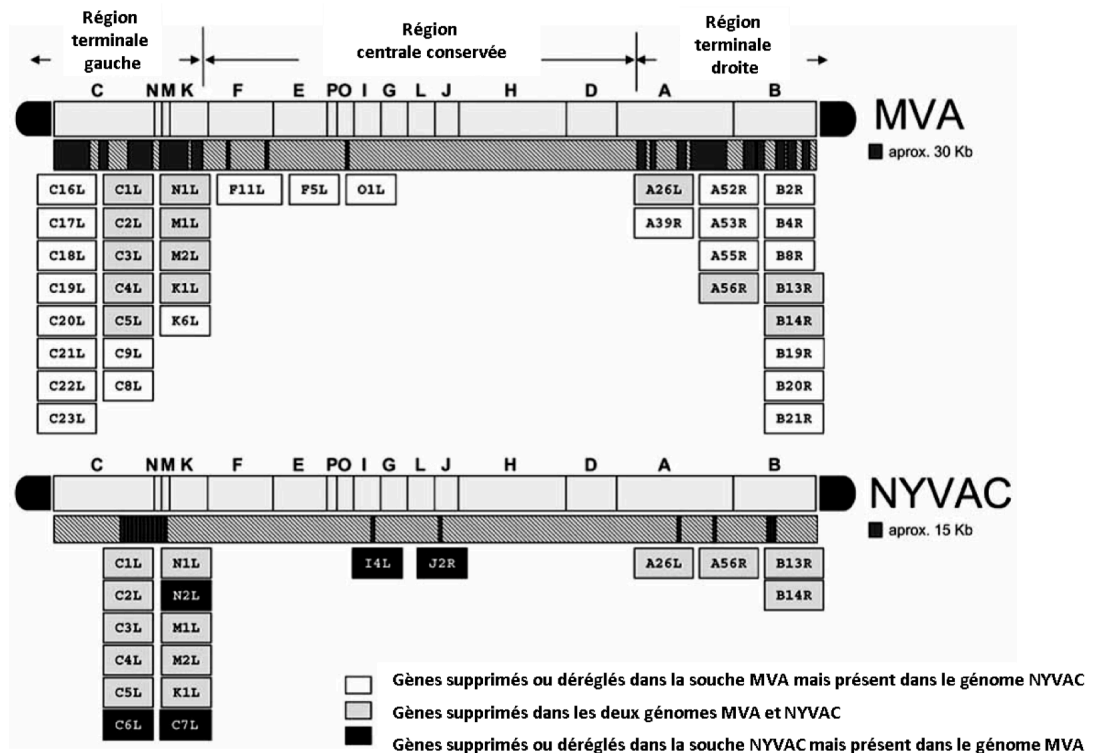
Les premiers Poxvirus recombinants ont été développés à partir du virus VV dont le génome est assez long et complexe (Panicali and Paoletti, 1982). Des stocks de ce virus recombinant avec un titre élevé peuvent être obtenus facilement et rapidement. De plus, il peut infecter de nombreuses espèces en induisant des réponses humores et cellulaires contre l'antigène choisi. Un des problèmes majeurs de l'utilisation de ce vecteur recombinant est le nombre de cas d'infections accidentelles chez les manipulateurs ou le personnel scientifique (Mempel *et al.*, 2003). En effet, à cause de l'éradication du virus de la Variole, les nouvelles générations ne sont pas vaccinées contre le virus de la Variole, ni contre le virus de la Vaccine utilisé comme vecteur vaccinal, ce qui augmente le risque de contamination dans les laboratoires de recherche.

Ce vecteur recombinant a été utilisé pour développer un vaccin vétérinaire contre le virus de la rage, Raboral V-RG[®] (Merial). Le virus VV recombinant codant pour la glycoprotéine du virus de la rage est utilisé pour lutter et enrayer les épidémies de rage dans le monde et notamment en France (Walsh and Dolin, 2011; Weyer, Rupprecht, and Nel, 2009). De par son immunogénicité, très peu d'études cliniques utilisent ce vecteur recombinant chez l'homme.

2.1.2 Le virus MVA

Pendant la période d'éradication de la Variole, plusieurs effets secondaires ont été observés, allant parfois jusqu'à la mort de la personne vaccinée, phénomène dépendant de la population vaccinée, de la souche vaccinale utilisée ou encore de la méthode de préparation. Afin d'augmenter la sécurité liée à l'utilisation du virus de la Vaccine, des souches virales ont été développées comme le virus de la Vaccine Ankara modifié ou MVA (*Modified Vaccinia virus Ankara*) (Pastoret and Vanderplasschen, 2003). Ce virus atténué a été obtenu après 500 passages répétés sur des cellules embryonnaires de poulets. Cette souche, déletée d'une vingtaine de gènes, possède une capacité réduite à se répliquer au sein des cellules de mammifère incluant les cellules humaines (Figure 5A). Elle n'induit aucune pathologie ni symptôme, ni chez des animaux immunodéprimés ni chez l'homme, la rendant beaucoup moins dangereuse que le virus parental (Moss, 1996). Ce virus a été modifié par recombinaison homologue afin d'accueillir un gène d'intérêt. Une fois les

A



B

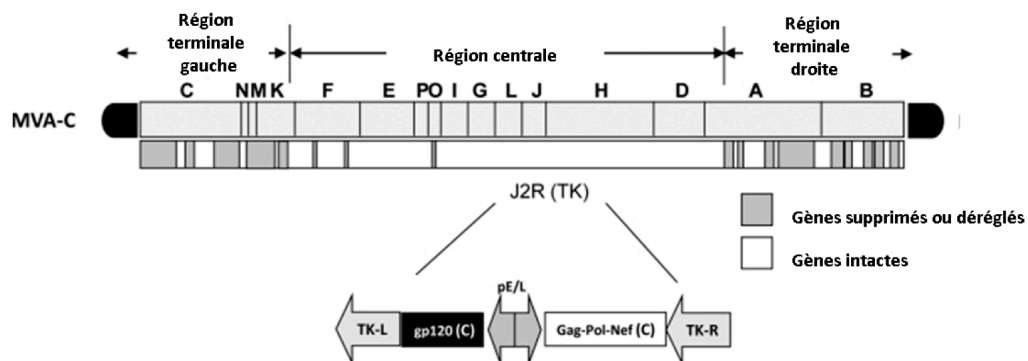


Figure 5. Schéma des génomes MVA, NYVAC et d'un MVA recombinant

A. Comparaison des gènes supprimés entre les souches MVA et NYVAC et les gènes du virus VV sauvage. **B.** Représentation d'un MVA modifié afin d'accueillir des gènes du virus HIV de clade C. Pour obtenir ce MVA-C, un plasmide a tout d'abord été construit portant les gènes *gag-pol-nef* et *env*, entourés par des séquences de la thymidine kinase, TK-L (gauche) et TK-R (droite). Des cellules ont été transfectées par ce plasmide puis infectées par le virus MVA. Une recombinaison homologue entre le gène *TK* au locus J2R contenu dans le génome du MVA et les séquences TK présentes sur le plasmide ont lieu conduisant à l'insertion de cette séquence codante dans le génome du MVA. La séquence pE/L représente des promoteurs du VV synthétique précoces (E) et tardifs (L). Schéma modifié de (Gomez *et al.*, 2008; Gomez *et al.*, 2012). Les virus NYVAC recombinants sont construits par insertion de la cassette d'expression au niveau du locus J2R qui, dans cette souche est remplacé par des sites de clonages multiples. Ainsi, dans les virus NYVAC recombinants, le locus J2R est supprimé.

cellules infectées, le vecteur recombinant permet l'expression de la protéine d'intérêt durant les phases précoces et tardives du cycle viral mais également de toutes les autres protéines virales (Figure 5B) (Sutter and Moss, 1992). Le virus n'est bloqué qu'au stade de formation IV des particules virales soit, au stade de formation de particules virales immatures (Gomez *et al.*, 2008).

Malheureusement, dans certains cas, les cellules infectées par ce virus ne sont plus capables de réaliser certaines glycosylations importantes, pouvant nuire à la production de la protéine d'intérêt (Sanger *et al.*, 2001). Que ce soit chez la souris ou le singe, *in vivo*, ce vecteur semble induire préférentiellement une réponse cellulaire de type CD8+ (Gomez *et al.*, 2008). Ce vecteur est utilisé aussi bien comme vecteur vaccinal contre le virus de la rage que contre le virus de l'Hépatite C ou encore le virus HIV. Un tableau représentant les différentes études précliniques et les essais cliniques utilisant ce vecteur jusqu'en 2008 est représenté dans la publication de Gomez *et al.* (Gomez *et al.*, 2008). La plupart de ces études ont montré que l'utilisation d'un Poxvirus atténué induisait des réponses immunitaires plus faibles que lorsque ce vecteur était utilisé en combinaison avec un vecteur hétérologue ou avec de l'ADN, ce qui augmente la complexité de ce genre de vaccination. Plus récemment, un vecteur MVA codant pour les protéines Env / Gag - Pol - Nef du virus HIV de clade C a été étudié en détail pour sa capacité à activer les cellules dendritiques humaines. Il a également été étudié chez la souris dans une stratégie de primo-injection / rappel avec de l'ADN montrant sa capacité à induire des réponses T polyfonctionnelles et des cellules mémoires (Gomez *et al.*, 2012). Ce vecteur MVA en association avec de l'ADN représente une étude intéressante pour développer un vaccin contre le virus HIV.

2.1.3 Le virus de la Vaccine atténué : NYVAC

Le virus atténué NYVAC a été obtenu par manipulation ciblée du génome d'une souche de virus de la Vaccine isolé à Copenhague. Une délétion a été effectuée sur 18 gènes, jouant un rôle dans la virulence, la pathogénicité et quelques fonctions régulatrices impliquées dans la réplication du virus au sein de certaines espèces (Figure 5A). Ce virus atténué est incapable de produire des particules infectieuses chez l'homme, et sa capacité à se répliquer dans des cellules humaines est très réduite (Pastoret and Vanderplasschen, 2003). Une infection de cellules HeLa par le virus NYVAC montre une restriction dans la synthèse des protéines tardives et un blocage de la morphogénèse plus précoce que pour le virus MVA.

Une insertion d'une séquence codante au sein du génome de ce virus a conduit au développement de vecteurs NYVAC (Figure 5B, même principe que pour les vecteurs MVA). Chez le singe ou la souris, le vecteur NYVAC semble induire une réponse cellulaire

préférentiellement de type T CD4⁺ (Gomez *et al.*, 2008). Une étude comparative entre les vecteurs MVA et NYVAC montre que lors d'une infection des CD humaines immatures, le vecteur MVA conduit à l'expression de nombreux gènes immuno-modulateurs alors que le vecteur NYVAC induit préférentiellement la production d'IFN de type I (Gomez *et al.*, 2008). De plus, une injection de ces deux vecteurs codant pour un antigène identique chez la souris montre que le vecteur MVA induit l'expression de l'antigène plus rapidement que le vecteur NYVAC. Cependant, le vecteur NYVAC reste plus longtemps présent dans l'organisme que le vecteur MVA (Gomez *et al.*, 2008). Des essais de vaccination utilisant le vecteur NYVAC ont été réalisés contre différentes infections virales telles que le virus de la rage, le virus JEV ou encore contre le virus responsable de la maladie de Carré. Un tableau représentant les différentes études précliniques et les essais cliniques utilisant le vecteur NYVAC est présenté dans la publication de Gomez *et al.* (Gomez *et al.*, 2008).

2.1.4 Le Canarypox ou ALVAC

Une autre alternative à l'utilisation du virus de la Vaccine sauvage a été d'utiliser les Poxvirus aviaires qui ont démontré leur non pathogénicité et leur incapacité à se répliquer au sein d'espèce non aviaire telle que l'homme (Pastoret and Vanderplasschen, 2003). Ainsi, le Poxvirus de canari, Canarypox, également connu sous le nom ALVAC, a été utilisé dans de nombreux essais de vaccination. Ce vecteur ALVAC permet l'expression de l'antigène dans les phases précoces de l'infection virale et délivre cet antigène au sein du système immunitaire. Un facteur limitant pour l'utilisation de ce vecteur est la mise en place d'un système de défense cellulaire suite à l'infection de cellules de mammifères. Ce facteur peut cependant être contourné par l'ajout de certains gènes du virus de la Vaccine (Fang *et al.*, 2001).

Ce vecteur ALVAC est utilisé dans de nombreuses études vaccinales vétérinaires ciblant notamment les virus de la rage, le virus WNV et le virus responsable de la maladie de Carré (Poulet *et al.*, 2007). Par exemple, chez le chat, l'injection du vecteur ALVAC codant pour des antigènes du virus de la Leucose Féline (FeLV) permet de protéger les animaux contre une épreuve virale. Cette protection est due à la présence de réponses cellulaires fortes contre les antigènes du virus FeLV. En revanche, aucun anticorps neutralisant n'a pu être détecté (El Garch *et al.*, 2006). De plus, dans certains cas, une seule dose de vecteur ALVAC semble nécessaire pour protéger les animaux contre une épreuve virale (Poulet *et al.*, 2007). La persistance des réponses immunitaires induites par le vecteur ALVAC a été évaluée chez le chat et le cheval et ces réponses permettent de protéger les animaux jusqu'à un an après la dernière vaccination (Poulet *et al.*, 2007). De plus, ce vecteur a démontré une autre caractéristique intéressante. En effet, une immunité préexistante anti-Canarypox ALVAC

n'empêche en rien une réinjection de ce vecteur au sein du même organisme. Ceci a été démontré pour un vecteur ALVAC codant pour une protéine du virus WNV, réinjecté à plusieurs reprises chez le cheval et dont aucun anticorps neutralisant anti-ALVAC n'a pu être détecté (Poulet *et al.*, 2007).

Enfin, ce vecteur est également utilisé chez l'homme dans de nombreux essais cliniques de vaccination de par l'absence d'immunité naturelle contre ce virus aviaire. Récemment, une étude clinique de phase III pour lutter contre le virus HIV a été réalisée en Thaïlande sur plus de 16 000 personnes. Un vecteur ALVAC codant pour de nombreux gènes du virus HIV (vCP1521, Sanofi Pasteur) a été utilisé en association avec des injections de protéine gp120 recombinantes du HIV. Cette étude a montré que la combinaison vecteur vaccinal ALVAC / protéine était sans danger pour la population concernée, mais seulement 30 % de la population vaccinée a été protégée contre une infection virale (Pitisuttithum *et al.*, 2011).

2.2 LE VIRUS DE LA STOMATITE VÉSICULAIRE

Le virus de la Stomatite Vésiculaire ou VSV (*Vesicular Stomatitis Virus*) est un virus à ARN négatif appartenant à la famille des *Rhabdoviridae* (Figure 6A). Il induit préférentiellement des maladies chez les chevaux, les porcs, les bovins, les chevreuils et les rongeurs. Un des déterminants de la pathogénicité du VSV est sa glycoprotéine d'enveloppe G. En effet, certaines études ont montré qu'en supprimant cette protéine d'enveloppe du virus, les animaux infectés ne développent plus aucune maladie et ne produisent plus d'anticorps neutralisants contre le VSV (Martinez *et al.*, 2003; Roberts *et al.*, 1999). Chez l'homme, l'infection par le virus VSV est rare et le plus souvent asymptomatique.

De nombreuses études ont montré son potentiel comme vecteur de transfert de gènes et comme vecteur vaccinal (Figure 6B et C) (Geisbert and Feldmann, 2011). Une séquence d'ARN de 4,5 kb maximum peut être insérée dans un VSV recombinant. Une fois la cellule hôte infectée, le VSV recombinant reste exclusivement dans le cytoplasme, exprime l'antigène en intracellulaire, en quantité importante et sur une longue période. L'expression de cet antigène permet l'induction de fortes réponses cellulaires et humorales et peut également suivant la voie d'administration, induire une réponse immunitaire muqueuse importante lors de la vaccination contre des maladies sexuellement transmissibles (Roberts *et al.*, 1998).

De plus, la production de ce vecteur recombinant permet d'obtenir de grandes quantités de virus et ce vecteur est capable d'infecter de nombreux types cellulaires de mammifères. La faible séroprévalence d'anticorps anti-VSV dans la population humaine ainsi

que sa faible pathogénicité, en font un très bon candidat pour la vaccination de la population humaine (Geisbert and Feldmann). De plus, trois sérotypes de VSV ont été décrits, la souche de l'Indiana, la souche du Chandipura et la souche du New Jersey. Afin de réaliser plusieurs injections de VSV recombinants chez les animaux, la glycoprotéine G (élément le plus immunogène) d'une souche a été remplacée par une autre afin de s'affranchir des AcN développés lors de la première injection (Rose *et al.*, 2000).

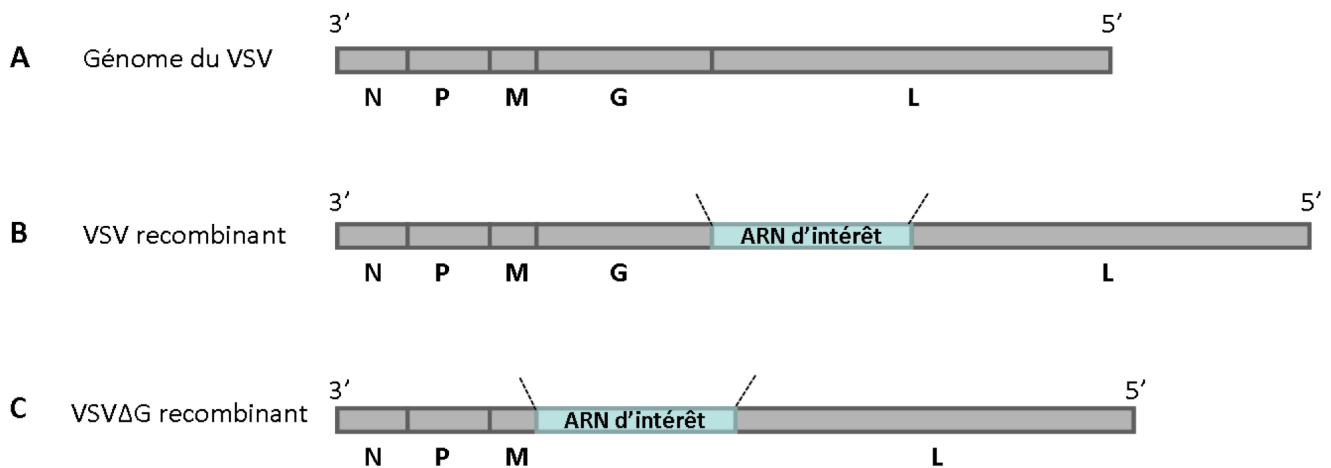


Figure 6. Représentation schématique génomique du VSV et des vecteurs VSV recombinants

A. L'ARN génomique de brin négatif est représenté dans le sens 3' à 5'. Il est composé des gènes codant pour les protéines de nucléocapside (N), des phosphoprotéines (P), des protéines de matrice (M), des glycoprotéines d'enveloppe (G) et des protéines larges (L). Chaque région intergénique contient un signal transcriptionnel START/STOP reconnu par la polymérase du VSV. **B.** et **C.** Deux types de vecteurs recombinants peuvent être construits : la séquence d'intérêt est insérée entre les gènes G et L (VSV recombinant) ou le gène G est remplacé par la séquence d'intérêt (VSVΔG recombinant). La séquence d'intérêt est également sous le contrôle des signaux transcriptionnels. Schéma inspiré de (Roberts *et al.*, 1999).

Ce vecteur recombinant a été utilisé dans de nombreux essais de vaccination. Un VSV codant pour la protéine HA du virus de la grippe a été injecté à plusieurs reprises chez la souris et a permis sa survie après une épreuve virale par le virus de la grippe (Roberts *et al.*, 1998). Comme décrit précédemment, le VSV sauvage induit une maladie rarement mortelle chez de nombreux animaux d'élevages. Les vecteurs VSV recombinants sont moins pathogènes que le virus sauvage mais induisent quelques symptômes lors de la vaccination chez le rongeur, comme une perte de poids variant de 10 à 19 % (Roberts *et al.*, 1998). En 2001, un vecteur VSV recombinant portant les gènes *env* et *gag* du HIV a été injecté à plusieurs reprises chez des macaques *rhésus* qui ont ensuite été infectés par le virus sauvage et ces animaux n'ont développé aucun signe de la maladie (Rose *et al.*, 2001). Plus récemment en 2011, un VSV, dont la glycoprotéine G a été supprimée, a été utilisé comme vaccin contre les virus émergents Ebola et Marburg. De plus, ce vaccin a également été

utilisé à des fins thérapeutiques avec plus ou moins de succès, suivant le temps séparant l'infection virale de l'injection (Geisbert and Feldmann, 2011). Afin d'augmenter la sécurité liée à l'utilisation de ce vecteur vaccinal pour une future utilisation chez l'homme, des mutations de la protéine G ont été réalisées (Publicover, Ramsburg, and Rose, 2004). À ce jour, aucun vecteur VSV n'est utilisé comme vecteur vaccinal pour des essais clinique chez l'homme.

2.3 LE VIRUS DE L'ENCÉPHALITE ÉQUINE VÉNÉZUELIENNE

Le virus de l'Encéphalite Equine Vénézuélienne ou VEE est un *Alphavirus* possédant un ARN positif et une enveloppe virale (Figure 7A.). Ce pathogène infecte préférentiellement les chevaux et les hommes provoquant, notamment, des encéphalites aiguës associées à une forte mortalité chez les chevaux. Ce virus est apparu en 1935 en Colombie puis a disparu de 1973 jusqu'à 1992 où de nouvelles épidémies ont été recensées, preuve d'une réémergence

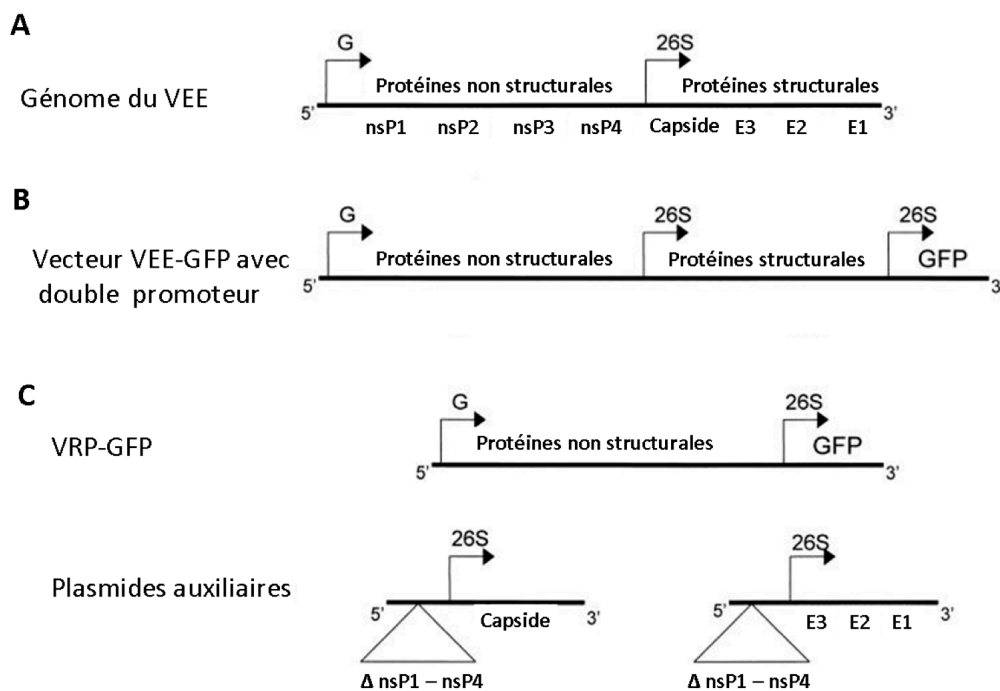


Figure 7. Organisation génomique du VEE et des vecteurs VEE recombinants

A. Le génome à ARN de sens positif (5'-3') est composé du promoteur génomique (G), du promoteur sub-génomique 26S (26S), des protéines non structurales (nsP1 à nsP4), du gène de la capsid et des gènes des glycoprotéines d'enveloppe (E1 à E3). **B.** et **C.** Deux vecteurs recombinants codant pour la GFP (*Green fluorescent protein*) ont été construits, soit en rajoutant un deuxième promoteur 26S (VEE-GFP double promoteur), soit en remplaçant les gènes des glycoprotéines d'enveloppe par la cassette d'expression (VRP-GFP). Dans le cas des VRP, des plasmides auxiliaires sont nécessaires pour former des particules virales, apportant en *trans* les gènes de la capsid et des glycoprotéines d'enveloppe. Schéma inspiré de (MacDonald and Johnston, 2000).

de ce virus. Le génome du VEE est composé de gènes codant pour les protéines non structurales responsables de la réplication et de la transcription, et d'un promoteur 26S contrôlant l'expression des protéines structurales à savoir, les protéines de la capsidie et les glycoprotéines d'enveloppe E1, E2 et E3 (Weaver *et al.*, 2004).

Un VEE atténué a été utilisé en 1961 pour vacciner les populations équine et humaines contre ce virus (souche TC-83). Il s'est avéré efficace et sans danger chez les chevaux mais a entraîné de nombreux effets secondaires chez le personnel de laboratoire et les militaires (Weaver *et al.*, 2004).

Depuis fin 1990, le VEE a été de plus en plus étudié comme vecteur viral afin d'exprimer des protéines hétérologues (Schlesinger and Dubensky, 1999). Ainsi, deux systèmes vectoriels permettant l'expression d'une protéine hétérologue ont pu être développés à partir de ce virus. Le premier système repose sur l'intégration dans le génome viral d'un deuxième promoteur ARN 26S, suivi du gène hétérologue, tout en conservant intacts les autres gènes viraux (Figure 7B). Ce vecteur est capable de se répliquer au sein d'une cellule infectée et de se disséminer dans les cellules voisines tout en exprimant la protéine hétérologue. L'utilisation de ce vecteur *in vivo* permet non seulement, une immunisation contre le VEE, mais également contre le pathogène d'où provient la protéine hétérologue (Pushko *et al.*, 1997).

En revanche, le deuxième système développé est beaucoup plus sûr. En effet, les gènes structuraux du VEE sont supprimés et remplacés par le gène hétérologue sous contrôle du promoteur 26S (Figure 7C) (Schlesinger and Dubensky, 1999; Weaver *et al.*, 2004). Une plus grande séquence étrangère peut ainsi être insérée. Les gènes structuraux sont apportés *in trans* par des constructions auxiliaires afin de produire des particules enveloppées portant le génome modifié (Figure 7C) (Pushko *et al.*, 1997). Ce système évite de cette façon la production de nouvelles particules virales au sein des cellules infectées. Ces nouveaux vecteurs aussi appelée « VRP » (*VEE Replicon Particle*) possèdent de nombreuses caractéristiques. Elle permet notamment la production de la protéine hétérologue en grande quantité impliquant qu'une faible dose de particules VRP suffit pour une utilisation *in vivo*. Aucune dissémination des particules n'a lieu au sein de l'organisme infecté. En effet, une fois que le vecteur viral est entré dans la cellule cible, seules les productions des protéines non structurales et de la protéine hétérologue ont lieu. L'absence de production de protéines structurales, comme les glycoprotéines d'enveloppe au sein de la cellule infectée, permet de diminuer les réponses immunitaires dirigées contre le VEE qui pouvaient avoir lieu. Lors d'une injection de VEE par voie sous-cutanée, les cellules dendritiques dermales ou cellules de Langerhans sont les premières cellules infectées par le virus. Ces cellules migrent ensuite jusqu'aux ganglions lymphatiques les plus proches avant leur activation. La glycoprotéine

d'enveloppe E2 est essentielle pour l'adressage des VEE aux cellules dendritiques (MacDonald and Johnston, 2000). De la même façon, les VRP ciblent les tissus lymphoïdes, un site privilégié pour stimuler le système immunitaire.

Bien que ces vecteurs recombinants ne soient pas utilisés pour des études de vaccination dans des essais cliniques chez l'homme, de nombreuses études ont eu lieu chez les animaux. La vaccination de souris par les VRP protège les animaux contre des infections virales comme le virus de la grippe, le RVFV (Dodd *et al.*, 2012; Pushko *et al.*, 1997). Des chevaux vaccinés par une VRP codant pour deux glycoprotéines d'enveloppe du virus de l'Artérite Equine sont protégés contre ce virus (Balasuriya *et al.*, 2002). Une étude de vaccination chez les poulets utilisant une VRP codant pour la protéine HA du virus de la grippe a également été réalisée (Schultz-Cherry *et al.*, 2000). Les VRP sont aussi utilisées chez le macaque contre le virus Marburg, le virus de l'Immunodéficience simienne (SIV) et protègent les animaux contre une épreuve virale mortelle (Davis *et al.*, 2000; Hevey *et al.*, 1998; Johnston *et al.*, 2005).

2.4 L'ADÉNOVIRUS

L'Ad est un des virus les plus étudiés et a servi de modèle pour la compréhension de divers mécanismes biologiques. C'est un virus non enveloppé à ADN db linéaire de 35 à 38 kb, appartenant à la famille des *Adenoviridae*. Son génome est composé de 5 gènes précoces (*E1*, *E2*, *E3*, *E4* et *E5*), deux gènes intermédiaires exprimés pendant la réplication virale (*IX* et *IVa2*) et de 5 gènes tardifs (*L1* à *L5*) (Figure 8A). De nombreux sérotypes d'Ad ont été isolés à partir de plusieurs espèces de mammifères et sont pour beaucoup d'entre eux, espèce dépendants. À ce jour, 52 sérotypes humains (AdHu) ont été découverts et sont répartis en 7 espèces (A-G). Vingt-sept sérotypes provenant du singe dont 7 des chimpanzés ont également été répertoriés.

La pathologie engendrée par ce virus est très dépendante du sérotype. Chez une personne saine, les Ad sont responsables d'infections souvent bénignes ou asymptomatiques et peuvent persister de façon chronique dans les amygdales des sujets infectés. Certains sérotypes sont responsables de pathologies plus sévères comme les sérotypes humains 40 et 41. Les virus AdHu2 et AdHu5, très peu pathogènes, sont retrouvés très fréquemment dans la population humaine. Le pourcentage d'anticorps dirigés contre l'AdHu5 varie de 45 à 80 % selon les régions étudiées (Chirmule *et al.*, 1999). Les Adénovirus humains peuvent infecter différents types cellulaires comme les cellules neuronales, les cellules épithéliales, les fibroblastes et les lymphocytes (Randrianarison-Jewtoukoff and Perricaudet, 1995).

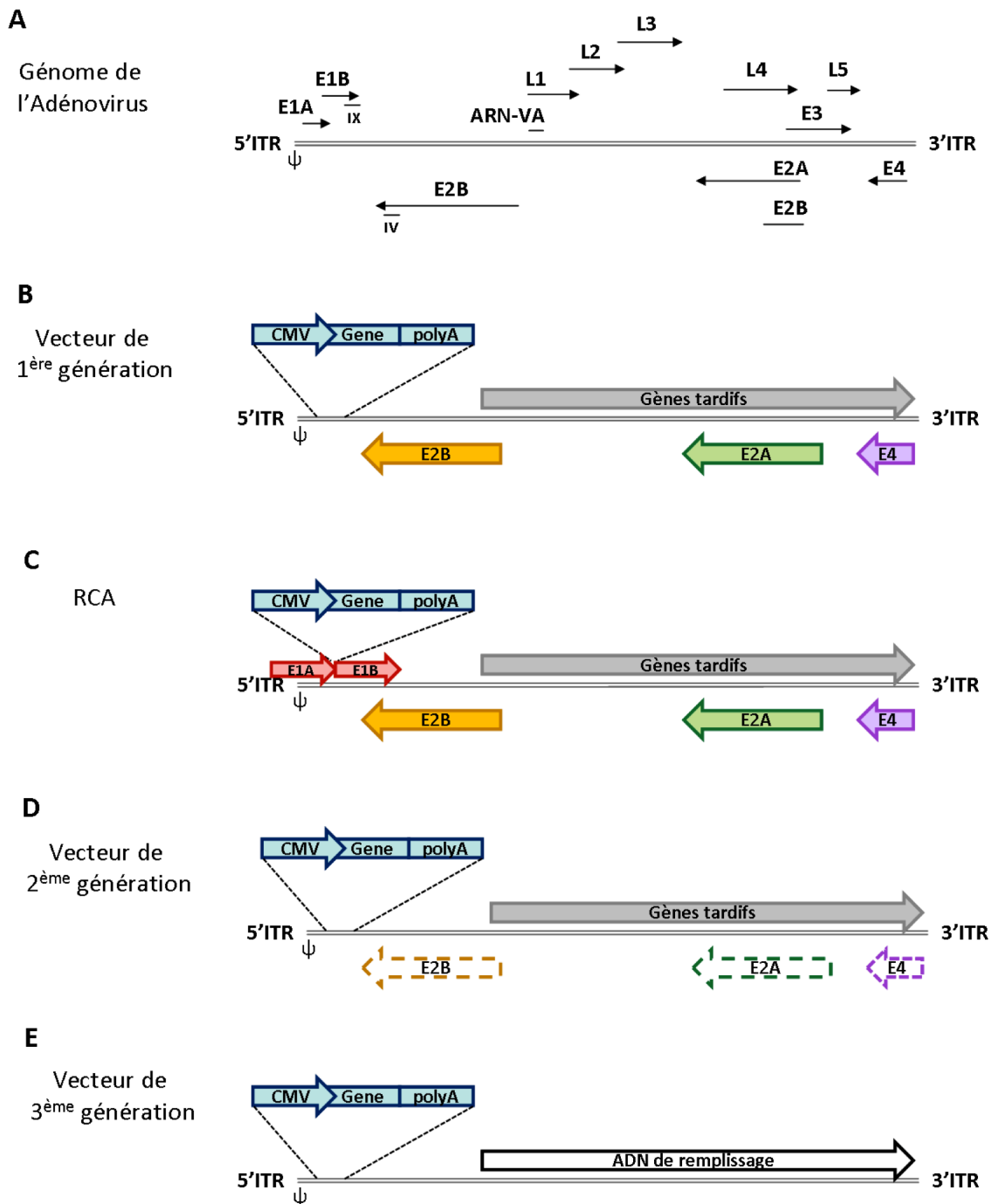


Figure 8. Organisation du génome de l'Adénovirus et de ces vecteurs recombinants

A. Génome à ADN db linéaire composé des gènes précoces (*E1* à *E4*), intermédiaires (*IX* et *IV*) et des gènes tardifs (*L1* à *L5*). Ce génome est encadré par 2 répétitions terminales inversées ou ITR. **B.** Construction des vecteurs Ad de 1^{ère} génération. Les gènes *E1A* et *E1B* sont supprimés et remplacés par la cassette d'expression, le gène *E3* est également supprimé. **C.** Formation des RCA par recombinaison homologue entre un vecteur de 1^{er} génération et les cellules HEK-293 contenant le gène *E1*. Les RCA récupèrent les gènes *E1A* et *E1B* entourant la cassette d'expression. **D.** Construction des vecteurs Ad de 2^{ème} génération. Le gène *E2* (*E2A* ou *E2B*) ou *E4* est supprimé. **E.** Représentation des vecteurs de 3^{ème} génération ou « helper-dépendant ». Tous les gènes viraux sont supprimés sauf les ITR et un ADN de remplissage est utilisé pour combler le vide. Schéma inspiré de (Tatsis and Ertl, 2004; Weaver *et al.*, 2009).

En 1969, des épidémies de pneumonies aiguës provoquées par l'AdHu4 et l'AdHu7, touchant les jeunes populations ont conduit à l'utilisation de l'Ad comme vaccin vivant atténué pour protéger l'armée américaine. Ces campagnes de vaccinations ont dû être stoppées car il a été démontré que l'Ad humain peut induire des cancers chez certains animaux. En revanche, le pouvoir oncogénique de l'Ad chez l'homme n'a pas encore été démontré (Imler, 1995; Randrianarison-Jewtougoff and Perricaudet, 1995).

L'Ad possède de nombreuses caractéristiques permettant son utilisation comme vecteur. Son génome est très bien décrit, facilement manipulable et ne s'intègre pas dans le génome de la cellule hôte. La plupart des sérotypes d'Ad induisent de légers symptômes chez les personnes immunodéprimées. Ils peuvent être rendus défectifs pour la réplication et des titres viraux importants peuvent être obtenus *in vitro*. De nombreuses cellules quiescentes ou non peuvent être infectées par ces virus qui peuvent être administrés par différentes voies d'injections y compris par contact avec les muqueuses. De plus, une fois lyophilisées, les préparations d'Ad peuvent être stockées facilement et ne nécessitent pas de chaîne de froid (Randrianarison-Jewtougoff and Perricaudet, 1995; Tatsis and Ertl, 2004).

Les Adénovirus humains, de sérotype 2 et 5, ont tout d'abord été utilisés comme vecteur de transfert de gènes en thérapie génique grâce au développement des vecteurs Ad recombinants de 1^{ère} génération. Ces vecteurs ont été modifiés de telle sorte que le gène *E1* (*E1A* et *E1B*) responsable de l'activation des autres gènes de l'Ad a été supprimé et remplacé par le gène d'intérêt (Figure 8B). Afin d'augmenter la taille de l'insert jusqu'à 7,5 kb, le gène *E3* impliqué dans la production de protéines non essentielles pour la réplication du virus *in vitro* a été supprimé. Malheureusement, de nombreux problèmes liés à des recombinaisons homologues et aux réponses immunitaires engendrées par l'injection de ce vecteur sont apparus, limitant son efficacité *in vivo* (Wilson, 1996).

Lors de la production des vecteurs AdΔ*E1*, incapables de se répliquer seuls, des cellules HEK-293 exprimant constitutivement la protéine *E1* sont utilisées. Une recombinaison homologue entre le plasmide codant pour le gène d'intérêt entouré par les séquences Adénovirales et les séquences présentes à côté du gène *E1* dans les cellules a été observée. Cette recombinaison a conduit à la génération de particules virales compétentes pour la réplication aussi appelé RCA (*Replication-Competent Adenovirus*) contaminant de ce fait les stocks de préparations virales (Figure 8C). Certaines études ont été réalisées dans le but d'empêcher la formation de ces RCA. L'une d'elles a reposé sur le changement de type cellulaire, supprimant de ce fait les séquences homologues et empêchant la recombinaison (Fallaux *et al.*, 1998).

L'Ad sauvage ainsi que le vecteur recombinant Ad sont très immunogènes. Ils activent efficacement la réponse immunitaire innée en la stimulant par l'intermédiaire des

TLR présents à la surface des CD ou par l'activation des cascades de signalisation antimicrobiennes et inflammatoires (Zhu, Huang, and Yang, 2007). Par exemple, l'injection systémique d'AdHu5 chez la souris, le singe ou l'homme conduit à la production de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-12, l'IL-10 ou le TNF- α ainsi qu'à une accumulation de macrophages et de cellules dendritiques dans les tissus lymphatiques (Raper *et al.*, 2003; Schnell *et al.*, 2001; Zhang *et al.*, 2001). De plus, lors de l'infection par les vecteurs Ad de 1^{ère} génération, le gène d'intérêt est traduit mais tous les autres gènes viraux de l'Ad et les protéines pourront également être présentés aux CMH-I et CMH-II augmentant ainsi les réponses immunitaires contre le vecteur viral. Du fait de la forte stimulation de la réponse immunitaire innée et de l'inflammation des tissus, le vecteur Ad disparaît entre 2 et 3 semaines après l'injection (Dai *et al.*, 1995; Kay *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994a). Ceci est dû au recrutement rapide de cellules immunitaires T CD4⁺ et CD8⁺ qui détruisent toutes les cellules infectées. De plus, une réponse des lymphocytes B se met en place, et entraîne la production d'anticorps neutralisants dirigés contre les protéines de la capsid virale empêchant toute réinjection du vecteur Ad (Dai *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1996).

Les vecteurs de 2^{ème} génération ont été développés afin de diminuer les réponses immunitaires adaptatives. Pour cela, en plus de la suppression du gène *E1*, le gène *E4* ou *E2A* a également été supprimé (Figure 8D) (Gao, Yang, and Wilson, 1996; Yang *et al.*, 1994b). Ces vecteurs peuvent accueillir une cassette d'expression d'une taille de 9 à 10 kb (Benihoud, Yeh, and Perricaudet, 1999). Bien que ces vecteurs soient plus difficiles à produire que les vecteurs de 1^{ère} génération, les risques de recombinaison homologue conduisant à la production de RCA ont été nettement réduits.

Enfin, les vecteurs de 3^{ème} génération appelés vecteurs « minimum » (*gutless* ou *helper-dependant*) ne possèdent presque plus de séquences virales et une cassette d'expression de 36 Kd maximum peut être insérée (Figure 8E) (Benihoud, Yeh, and Perricaudet, 1999; Kochanek, 1999). Ces vecteurs induisent une forte réponse innée mais entraînent le développement de réponses adaptatives atténuées (Muruve *et al.*, 2004).

De nombreux vecteurs Ad ont été utilisés pour des essais de vaccination mais ce sont majoritairement des vecteurs de 1^{ère} génération, ceci étant dû notamment aux titres viraux faibles obtenus avec les vecteurs de 2^{ème} et 3^{ème} génération qui rendent leurs applications pour des essais clinique difficile.

Le sérotype AdHu5 de 1^{ère} génération a été utilisé comme vaccin contre de nombreux virus comme le virus de la rage, l'HBV, le MV et bien d'autres (Imler, 1995; Randrianarison-Jewtoukoff and Perricaudet, 1995; Tatsis and Ertl, 2004). Notamment en 2009, l'AdHu5 a été utilisé comme vaccin contre le HIV dans un essai clinique de phase I (Buchbinder *et al.*, 2008). Cette étude avait pour but de mesurer l'effet d'une immunité pré-existante contre

l'AdHu5 lors de la vaccination. Finalement, cette étude a montré qu'à cause de cette immunité, les personnes possédant des titres en anticorps neutralisants anti-Ad les plus élevés étaient beaucoup plus facilement infectées par le HIV que les autres personnes de l'essai. De plus, aucune conclusion n'a pu être réalisée concernant l'efficacité du vaccin chez les personnes non séropositives pour l'Ad. Des études supplémentaires ont été réalisées dans le but de trouver une explication à ce phénomène. Il a été montré que lorsque des cellules T d'un individu possédant des anticorps neutralisants contre l'Ad sont à nouveau stimulées par la vaccination avec l'Ad, les cellules T CD4+ mémoire localisées dans les muqueuses sont les plus susceptibles à l'infection par le HIV. Seules les études ciblant cette région de l'organisme ont pu révéler ce phénomène, qui n'a pas pu être visible en explorant les cellules immunitaires périphériques (Benlahrech *et al.*, 2009). Ce problème semble être spécifique à la vaccination anti-HIV. En effet, très récemment, les réponses cellulaires T CD8+ induites par un vecteur AdHu5 ont montré un effet protecteur contre une infection de primates non-humain par le virus EBOLA (Sullivan *et al.*, 2011). Enfin, seulement quelques essais ont été réalisés avec des vecteurs de 3^{ème} génération (Liu, 2010; Weaver *et al.*, 2009).

Afin de stimuler d'avantage les réponses immunitaires, des stratégies de primo-seconde injections ont été réalisées. Comme attendu, des injections répétées d'Ad ne permettent pas d'augmenter les réponses immunitaires notamment à cause de l'immunité humorale contre la capsid induite lors de la première injection. Une dose plus importante de vecteurs utilisée en seconde injection n'est pas envisageable à cause de la toxicité engendrée par une augmentation du nombre de particules injectées dans l'organisme. Plusieurs combinaisons ont été étudiées comme l'injection d'ADN suivit d'Ad ou encore l'injection de vecteurs recombinant Poxvirus suivit par une seconde injection d'Ad (Tatsis and Ertl, 2004).

Une stratégie alternative propose d'utiliser des sérotypes d'Ad d'autres espèces afin de contourner le problème de l'immunité pré-existante. Ainsi, les sérotypes simiens AdC68, AdC7 et AdC6 ont été très étudiés (Liu, 2010; Tatsis *et al.*, 2009). Un des avantages dans l'utilisation de ces sérotypes est qu'ils peuvent utiliser les protéines E1A et E1B du virus humain AdHu5 malgré une faible identité de séquence, empêchant les recombinaisons homologues (RCA) qui étaient observées lors de la production virale en cellules HEK-293. De plus, peu d'anticorps neutralisants dirigés contre ces sérotypes d'Ad ont été observés dans la population humaine (Tatsis and Ertl, 2004).

2.5 LES VECTEURS RETROVIRAUX ET LES PSEUDOPARTICULES RÉTROVIRALES

Les Rétrovirus forment la famille des *Retroviridae* et sont constitués d'une enveloppe externe qui entoure un noyau contenant la nucléocapside ou « core » (Figure 9A). Le core renferme le génome formé de deux molécules d'ARN simple brin (sb) identiques d'environ 9,5 kb. Leur génome comprend trois gènes de structure, les gènes *gag*, *pol* et *env*, codant respectivement pour : les protéines du core, les protéines participant à la rétrotranscription, l'intégration et à la protéolyse virale et pour les glycoprotéines d'enveloppe du virus. Le

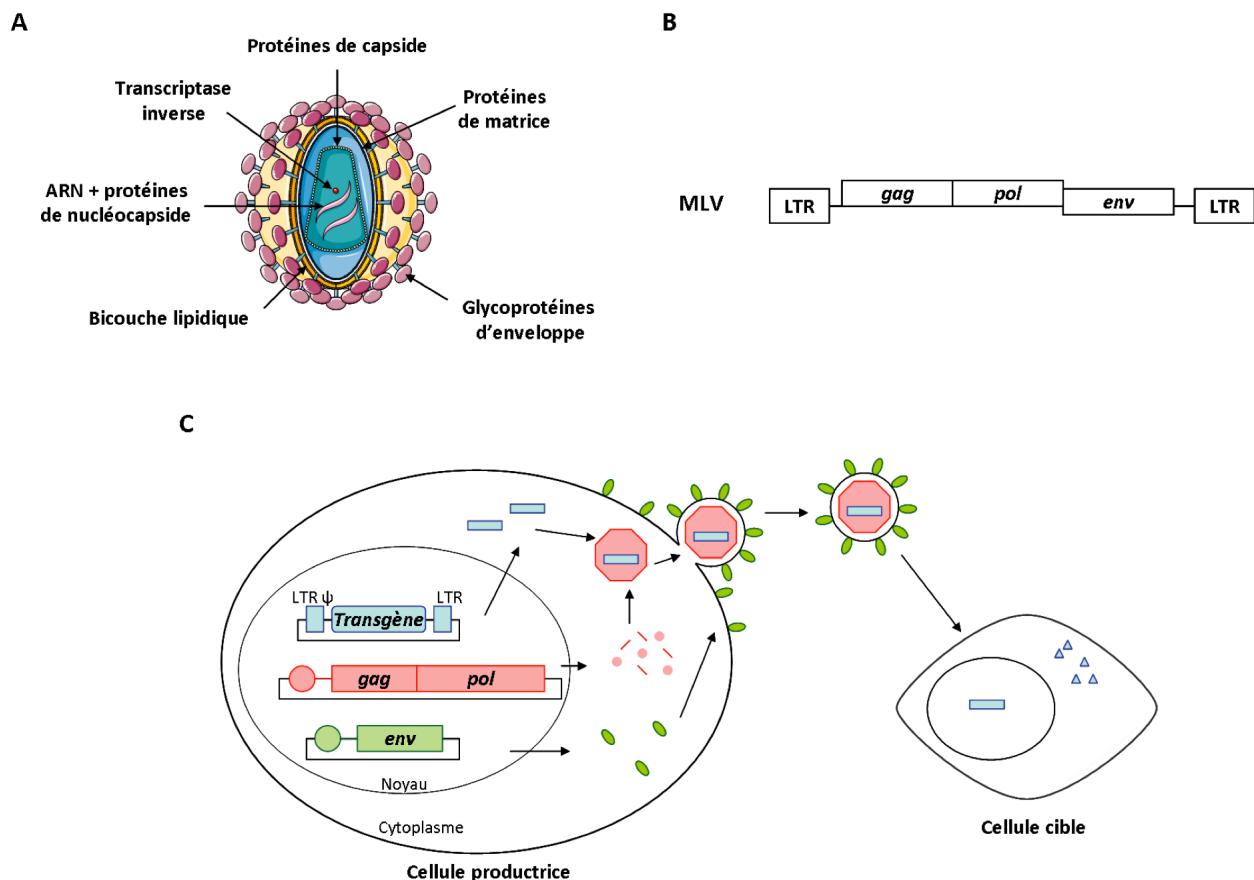


Figure 9. Les Rétrovirus et les vecteurs rétroviraux

A. Structure d'un Rétrovirus. **B.** Génome d'un virus de la Leucémie murine (MLV). L'ADN proviral est représenté composé des gènes *gag* et *pol* codant pour les protéines du core et les enzymes de réplication et le gène *env* code pour les glycoprotéines d'enveloppe. **C.** Production des vecteurs rétroviraux ou des pseudoparticules. Trois plasmides sont impliqués. Le vecteur portant la séquence d'intérêt possède toutes les fonctions pour son encapsidation (ψ), son intégration et sa production (LTR). Le plasmide d'encapsidation porte les fonctions nécessaires à la formation d'un virion *in trans* et ne porte pas de séquence ψ . Enfin, un plasmide permettant l'expression des glycoprotéines d'enveloppe nécessaires à la formation de particules infectieuses. Ces particules sont récoltées dans les surnageants de culture et utilisées pour infecter des cellules cibles où le transgène sera exprimé. Schéma inspiré (Buchsacher and Wong-Staal, 2000).

génomique est encadré par de longues répétitions terminales de tailles variable ou LTR (*Long Terminal Repeat*) qui permettent l'intégration, l'encapsidation du génome et l'expression des gènes viraux (Figure 9B). Une fois introduit dans la cellule hôte, l'ARN viral est rétrotranscrit en un ADN dit « *proviral* ». Cet ADN va s'intégrer dans le génome de la cellule infectée et persister dans le temps mais ce maintien est associé à de nombreuses maladies comme des cancers (Coffin, Hughes, and Varmus, 1997; Rubin, 2011).

Les vecteurs recombinants sont dérivés des Rétrovirus par des techniques de génie génétique. Parmi ces vecteurs, celui dérivé du virus de la Leucémie murine ou MLV (*Murine Leukemia virus*) a été utilisé dans ce travail de thèse. Le vecteur présent dans la particule contient la séquence codante d'intérêt, entourée par les LTR (Figure 9C). Ainsi, aucune séquence rétrovirale n'est présente dans ces particules à l'exception des LTR. Tous les éléments nécessaires à la formation d'une particule rétrovirale sont apportés en *trans* par divers plasmides dans les cellules productrices.

Ces particules sont capables d'encapsider un vecteur contenant une cassette d'expression, de le transporter jusqu'au noyau d'une cellule et de l'intégrer dans le génome de la cellule cible. Etant défectif pour la réplication, aucune nouvelle particule rétrovirale ne peut être produite (Coffin, Hughes, and Varmus, 1997). Ces vecteurs rétroviraux ont la particularité de pouvoir incorporer des glycoprotéines hétérologues à la surface des particules. On dit alors qu'ils sont pseudo-typés. Ainsi, dans le cas de la vaccination, l'antigène peut être soit exprimé par le vecteur contenu dans les particules, soit porté sous la forme de protéine à la surface des particules, soit les deux en même temps. Deux éléments définissent le pseudotypage de ces vecteurs rétroviraux : le core et la glycoprotéine d'enveloppe (Sanders, 2002). Selon la glycoprotéine d'enveloppe utilisée, les vecteurs pourront infecter des types cellulaires différents.

Ces pseudoparticules rétrovirales sont aussi appelées VLP (*Virus Like Particle*). Elles possèdent de nombreux usages en tant qu'outil moléculaire. En effet, les VLP dépourvues des glycoprotéines rétrovirales peuvent transporter une séquence codante d'un gène rapporteur comme la *gfp* et porter à leur surface les glycoprotéines du virus souhaité (Figure 9C). Ainsi par l'infection de cellules portant un certain type de récepteur, l'identification de composés à effet antiviral pourra être déterminée. De plus, lors d'une infection virale ou d'une vaccination utilisant un virus, les anticorps neutralisants induits sont le plus souvent dirigés contre les glycoprotéines d'enveloppe de ce virus. Au cours de ce travail, des VLP portant à leur surface des glycoprotéines d'intérêt ont été utilisées comme antigène pour détecter la présence d'anticorps spécifiques (voir Résultats, Chapitre 1.3.1).

Les vecteurs rétroviraux sont très intéressants pour la vaccination car suivant le type de glycoprotéines utilisées, de nombreuses cellules ou un sous-type de cellules peuvent être

infectés. De plus, le gène d'intérêt peut être produit en grande quantité. Enfin, ils sont incapables de se répliquer et ne peuvent produire aucune protéine rétrovirale. Cependant, l'intégration du vecteur au sein du génome de la cellule hôte n'est pas forcément à considérer comme un atout. En effet, l'intégration des vecteurs rétroviraux peut-être à l'origine d'une altération de l'expression de gènes cellulaires comme observé dans des essais de thérapie génique (Kaiser, 2003). De plus, des vecteurs injectés par voie intraveineuse (IV) pourraient infecter des cellules germinales et ainsi transmettre le vecteur aux descendants. Malgré ce point, les vecteurs rétroviraux et en particulier les VLP portant les antigènes à leur surface sont considérés comme de bons outils pour la vaccination. En effet, des antigènes, purifiés et directement injectés sont moins immunogènes que lorsqu'ils sont incorporés à la surface des VLP. Les vecteurs rétroviraux sont très peu utilisés en vaccination comme par exemple contre le HIV ou contre le virus de la grippe mais sont principalement utilisés en thérapie génique ou comme outil moléculaire (Neumann *et al.*, 2006; Pincha, Sundarasetty, and Striepecke, 2010; Szecsi *et al.*, 2009; Yi, Noh, and Lee, 2011).

Il est important de noter que les vecteurs rétroviraux dérivés du virus MLV ne sont pas les seuls vecteurs à avoir été développés. En effet, la famille des *Retroviridae* est notamment constituée du genre des *Lentivirus* dont fait partie le virus HiV. Son génome est plus complexe que celui du virus MLV car en plus des gènes *gag*, *pol* et *env*, il possède deux gènes régulateurs *tat* et *rev*, essentiels pour la réplication du virus, et 4 gènes accessoires *vif*, *vpu*, *vpr* et *nef*. Comme pour le virus MLV, des vecteurs viraux recombinants ont été développés à partir de ces lentivirus (Sakuma, Barry, and Ikeda, 2012). Ces lentivecteurs ont la capacité de transduire des cellules quiescentes alors que les vecteurs rétroviraux MLV ne transduisent que dans des cellules en division. De plus, ils ont montré à plusieurs reprises leurs capacités à infecter des CPA, dont les CD, et à exprimer l'antigène souhaité sur le long terme. Ces lentivecteurs ont également été utilisés dans des stratégies vaccinales dirigées contre le virus HiV ou le virus WNV et plus particulièrement dans la lutte contre le cancer (Aguilar Alpizar *et al.*, 2012; Di Nunzio *et al.*, 2012; He, Munn, and Falo, 2007).

3. LE VIRUS ADÉNO-ASSOCIÉ

La liste des vecteurs viraux décrits dans le chapitre précédent ne serait pas complète sans l'ajout du virus AAV (*Adeno-Associated Virus*). Ce virus a été modifié par une technique de génie génétique pour être transformé en vecteur viral recombinant pouvant porter des séquences codantes hétérologues. Bien qu'encore peu utilisé en vaccination, ce vecteur qui a fait l'objet de mon travail de thèse, comporte en effet un certain nombre de propriétés qui le rendent potentiellement très intéressant pour la vaccination.

3.1 LE VIRUS

L'AAV a été découvert en 1965 comme contaminant des préparations virales d'Adénovirus, d'où son nom (Figure 10A) (Atchison, Casto, and Hammon, 1965). Il appartient à la famille des *Parvoviridae*, comprenant des virus de faible complexité et de petite taille. En effet, l'AAV est un virus non enveloppé constitué d'une capsid de 20 nm de diamètre qui possède un génome à ADN sb linéaire codant pour uniquement deux gènes (Figure 10B). Compte tenu de la petite taille de son génome, aucun gène codant pour la polymérase virale n'est présente dans ce virus. En d'autres termes, ce virus ne code pas pour les protéines nécessaires à sa réplication. Il est dépendant de la machinerie cellulaire et d'autres facteurs apportés par un virus auxiliaire et est rattaché au genre des *Dependovirus* (Brown, 2010). Ainsi, l'AAV est incapable de se répliquer seul au sein d'une cellule, et ce quelle que soit la nature de cette cellule, et rentre donc en phase de latence. L'AAV ne peut réaliser sa phase de réplication qu'en présence d'un virus auxiliaire. À ce jour, quelques virus ont été décrits comme virus auxiliaire pour l'AAV, il s'agit des Adénovirus, du virus de l'Herpes simplex (HSV) de type 1, des Papillomavirus (HPV) (Buller *et al.*, 1981; Schlehofer, Ehrbar, and zur Hausen, 1986; Thomson *et al.*, 1994; Walz *et al.*, 1997). Seules les fonctions auxiliaires de l'Ad et de l'HSV-1 ont été étudiées et peu d'informations sont disponibles sur les autres virus auxiliaires (Geoffroy and Salvetti, 2005; Nicolas *et al.*, 2010).

Le génome de l'AAV possède deux gènes, *rep* et *cap* (Figure 10C). Le gène *rep* code pour les protéines de réplication Rep78, Rep68, Rep52, et Rep40, nécessaires notamment pour l'initiation de la réplication virale et l'expression des gènes viraux. Le gène *cap* est associé à deux cadres de lecture ouverts, *cap1* et *cap2* codant respectivement pour : les protéines structurales VP1, VP2, VP3, et pour l'AAP (*Assembly-Activating Protein*), une protéine nouvellement découverte et impliquée dans l'assemblage des capsides virales (Sonntag, Schmidt, and Kleinschmidt, 2010). Ces deux gènes sont entourés par des séquences identiques, appelées répétitions terminales inversées ou ITR (*Inverted Terminal Repeat*), en position 5' et 3' du génome, indispensables pour l'encapsidation, l'intégration, et la réplication.

Dès que la particule d'AAV rencontre sa cellule cible, elle va se fixer à la surface de cette cellule grâce à son récepteur et à des co-récepteurs, et va pouvoir pénétrer à l'intérieur de cette dernière par un mécanisme d'endocytose. Le devenir de cette particule, entre le moment où elle est entrée dans la cellule et le moment où elle atteint le noyau, est encore assez mal connu (Nonnenmacher and Weber, 2012). L'AAV pénètre dans le noyau vraisemblablement par une autre voie que celle des pores nucléaires puis les génomes sont décapsidés (Hansen, Qing, and Srivastava, 2001). A cette étape, le génome d'ADN sb de la

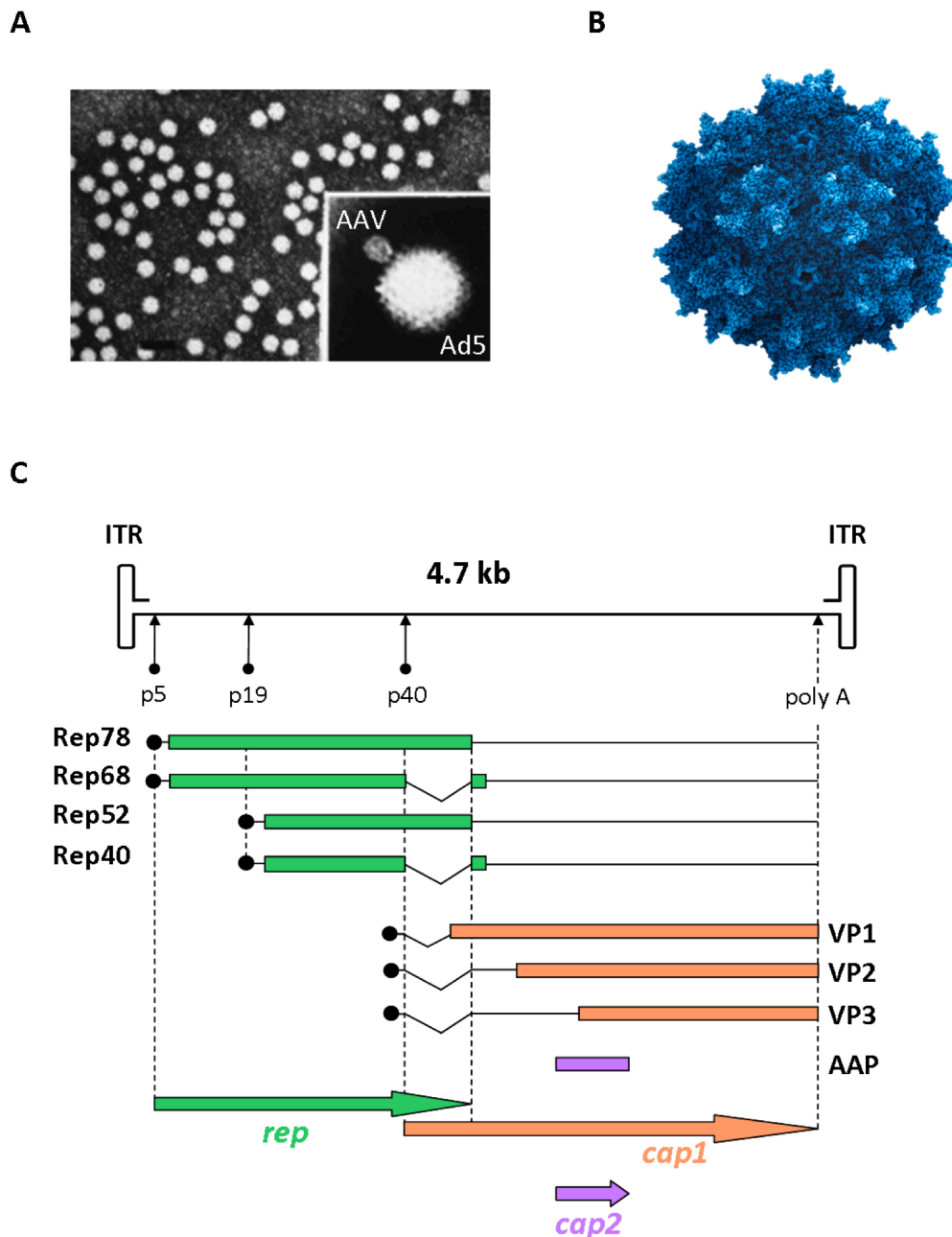


Figure 10. Le virus AAV et son génome

A. L'AAV a été découvert comme contaminant de préparations d'Ad de type 5 par microscopie électronique (Snyder and Flotte, 2002). **B.** Représentation cristalline de l'AAV déterminée par rayon-X avec une résolution de 3 Å (Xie *et al.*, 2002). **C.** Son génome est composé d'un ADN sb linéaire encadré par deux ITR identiques. Deux gènes sont représentés, le gène *rep*, associé à la phase ouverte de lecture du même nom est sous le contrôle de deux promoteurs p5 et p19. Il code pour les 4 isoformes des protéines non structurales Rep. Les protéines Rep68 et Rep40 subissent un épissage. Le 2^{ème} gène *cap* est associé à deux cadres de lecture *cap 1* codant pour les protéines structurales et *cap 2* pour la protéine AAP. L'ARNm issu de *cap 1* peut être épissé de trois façons différentes.

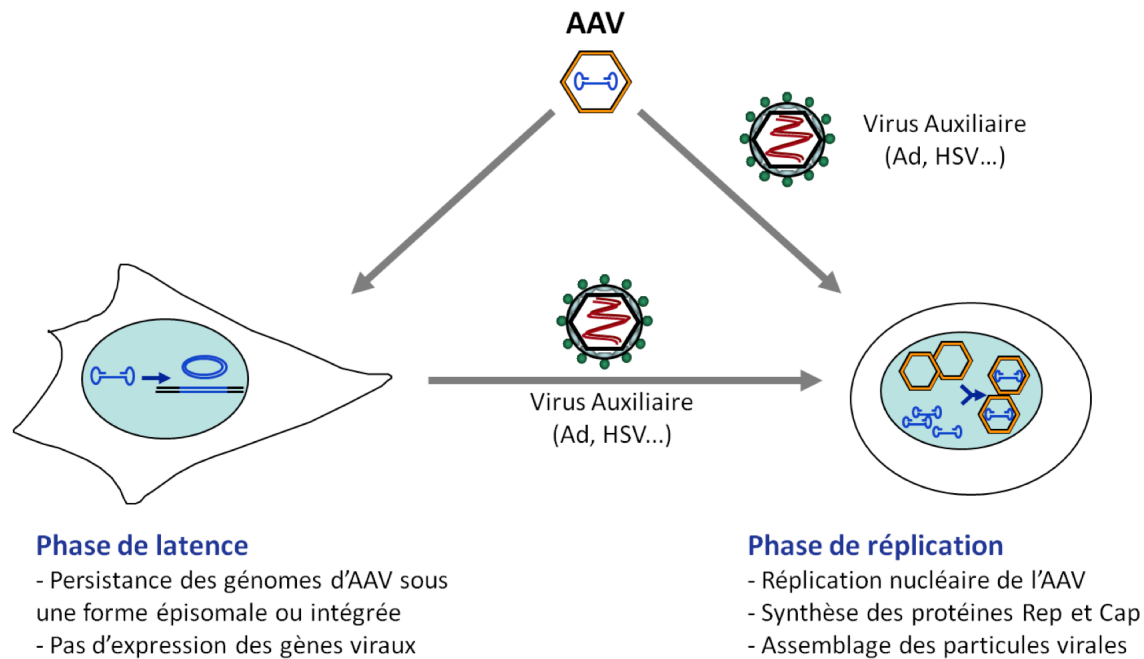


Figure 11. Cycle du virus AAV

particule d'AAV sauvage peut soit entrer en phase de latence, soit se répliquer en fonction de la présence ou non d'un virus auxiliaire (Figure 11) (Daya and Berns, 2008).

Pendant la phase de latence, le génome simple brin est converti en génome double brin (ADN db), forme transcriptionnellement active, soit par l'action d'une polymérase cellulaire, soit par l'association de deux génomes de polarité opposée (Nakai, Storm, and Kay, 2000; Zhong *et al.*, 2008). En effet, des génomes de polarité positive ou négative peuvent être encapsidés dans les particules d'AAV. Dans une production de particules, chaque brin est représenté en quantité égale. Après cette étape de conversion du génome simple brin en double brin, le génome s'établit en latence en persistant soit sous une forme épisomale circulaire soit sous une forme intégrée. Ainsi, suivant le type de cellules infectées, en division ou quiescentes, le virus persistera plus ou moins longtemps. Une autorégulation négative du gène *rep* conduit à une extinction totale de l'expression des gènes de l'AAV pendant cette phase. Les formes épisomales sont composées d'ADN db circulaire ou de concatémères de plus haut poids moléculaire. L'AAV est le seul virus humain privilégiant des sites d'intégrations spécifiques. L'intégration site-spécifique de l'AAV est Rep-dépendante et le site d'intégration le plus fréquent chez l'homme est le locus AAVS1 situé sur le chromosome 19 (Henckaerts and Linden, 2010). En effet, environ 40 – 70 % des intégrations se réalisent dans ce locus (Daya and Berns, 2008). De plus, il semblerait que plusieurs copies du génome y sont intégrées (Berns and Parrish, 2007).

Récemment, d'autres loci ont été caractérisés comme le site AAVS2 et AAVS3 (Huser *et al.*, 2010). Ces intégrations ont lieu grâce à la présence dans le génome humain de séquences de liaison à la protéine Rep ou RBE (*Rep Binding Element*) et au site de résolution terminale ou trs (*terminal resolution site*) (Daya and Berns, 2008).

En présence d'un virus auxiliaire, les gènes *rep* et *cap* sont activés. Le génome peut ainsi se répliquer et générer de nombreuses molécules d'ADN sb ainsi que des intermédiaires d'ADN db (Berns and Parrish, 2007; Henckaerts and Linden, 2010). En parallèle, les protéines de capsides sont synthétisées, importées et assemblées dans le nucléole grâce à la protéine AAP. Les capsides sont composées d'une soixantaine de protéines VP arrangées en structure icosaédrique. Dans une particule, il y a de 3 à 6 protéines VP1, de 3 à 6 protéines VP2, et de 48 à 54 protéines VP3, conduisant selon le nombre de protéines présentes aux ratios 1 : 1 : 10 ou 1 : 1 : 20. Le génome viral est constitué d'un brin positif ou négatif et est encapsidé grâce à l'activité hélicase des protéines Rep. La réplication de l'AAV s'effectue dans le noyau de la cellule, tout comme celle des virus auxiliaires. Les particules d'AAV ne sont libérées dans le milieu extracellulaire qu'après la lyse cellulaire engendrée par le virus auxiliaire. En effet, l'AAV n'induit aucun effet cytopathique en l'absence de virus auxiliaire. À ce jour, aucun autre mécanisme de libération des particules d'AAV n'a été mis en évidence.

Aucune pathologie n'est associée à une infection par le virus AAV ni liée à son intégration dans le génome (Flotte and Berns, 2005; Henckaerts and Linden, 2010). De plus, il semble que l'AAV pourrait avoir un rôle protecteur contre au moins une forme de cancer *in vitro* et *in vivo*. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, l'Ad peut transformer des cellules dans certaines conditions, y compris *in vivo*. Lors d'une co-infection AAV / Ad, l'AAV détourne des protéines de l'Ad pour sa propre réplication, diminuant ainsi la réplication de l'Ad au sein de la cellule infectée et empêchant une éventuelle transformation de gènes cellulaires (Labow, Graf, and Berns, 1987).

3.2 LES SÉROTYPES D'AAV

Le sérotype 2 est le 1^{er} sérotype à avoir été cloné en 1982. Il est le sérotype le plus étudié et le mieux caractérisé. Généralement dans la littérature lorsque le numéro du sérotype n'est pas spécifié, c'est qu'il s'agit de ce sérotype. En 1967, l'AAV a été isolé chez l'homme (Blacklow, Hoggan, and Rowe, 1967), puis retrouvé chez plusieurs espèces d'animaux dont les singes, les bovins, les chiens, les chevaux, les poulets, les serpents, les ovins et chez plusieurs espèces d'oiseaux (Wu, Asokan, and Samulski, 2006). Plusieurs sérotypes, classés selon des différences se situant au niveau des protéines de la capside

virale ont été découverts. Par définition, un nouveau sérotype est un virus qui ne réagit pas avec des anticorps neutralisants dirigés contre les sérotypes existants et déjà caractérisés. À ce jour, douze sérotypes ont été identifiés et classés de AAV1 à AAV12. Plus d'une centaine de variants ont été isolés de stocks d'Ad, d'origine humaine ou de primates non-humains (Figure 12A et B).

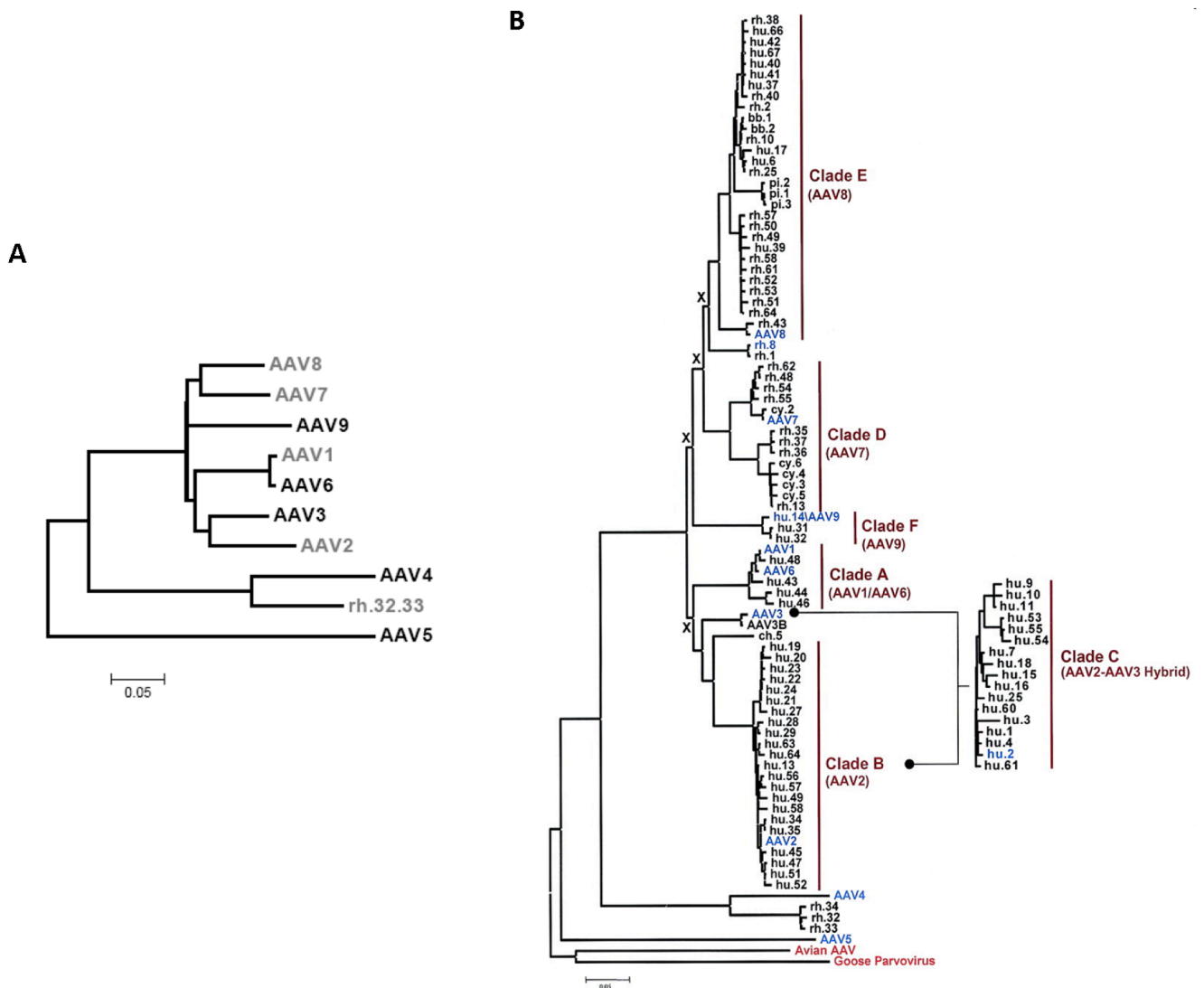


Figure 12. Arbre Phylogénétique des différents sérotypes et variants d'AAV

A. Phylogénie des principaux sérotypes d'AAV (Calcedo *et al.*, 2009). **B.** Représentation d'une partie des variants d'AAV et leur regroupement en *clade* phylogénétique (Gao *et al.*, 2004). Analyses phylogénétiques réalisées par la méthode de « *Neighbour joining* » basée sur la séquence protéique de la protéine de capsid VP1. Les nœuds ayant une valeur de « *bootstrap* » < 75 sont indiqués par un X. La barre d'échelle représente le nombre de substitution par site. (hu : humain, rh : macaque rhésus, cy : macaque cynomolgus, bb : babouin, pi : macaque à queue de cochon, ch : chimpanzé)

Les variants représentent de nouveaux isolats d'AAV non caractérisés. Ces variants ont été sous-divisés en « branches » (*clade*) suivant leur identité de séquence. Six branches

ont été répertoriées et notées de A à F (Figure 12B). Les sérotypes 1, 2, 3, 4 et 6 ont été isolés à partir de stock d'Ad préparés en laboratoire. Les sérotypes 1, 2, 3 et 6 sont d'origine humaine alors que l'AAV4 est d'origine simienne. L'AAV5 a quant à lui été isolé directement à partir de prélèvement humain. De plus, il semblerait que l'AAV6 soit un hybride entre les sérotypes AAV1 et AAV2. Les sérotypes d'AAV7 à AAV12 ont ensuite été isolés par PCR (réaction de polymérase en chaîne) à partir de produits provenant d'une séquence variable de capsid VP1 et sont d'origine simienne. Des variants de différentes origines ont été isolés de la même façon (Gao *et al.*, 2004; Gao *et al.*, 2002b; Grimm and Kay, 2003b; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

Les propriétés de ces sérotypes ont été essentiellement étudiées dans le contexte de leur utilisation comme vecteur de transfert de gène. Chaque sérotype possède un tropisme préférentiel d'infection bien que pas exclusif pour un organe ou un type cellulaire. En effet, l'AAV2 infecte de nombreux types cellulaires, mais est beaucoup moins efficace pour des cellules cibles intéressantes en thérapie génique comme le muscle, le foie ou les cellules hématopoïétiques. En revanche, l'AAV8 transduit préférentiellement le foie et le cœur ; l'AAV1 et l'AAV7 le muscle ; l'AAV5 la rétine ; et l'AAV9 et l'AAV10 le cerveau (Figure 13) (Gao *et al.*, 2006; Gao *et al.*, 2002b; McCown, 2011 ; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

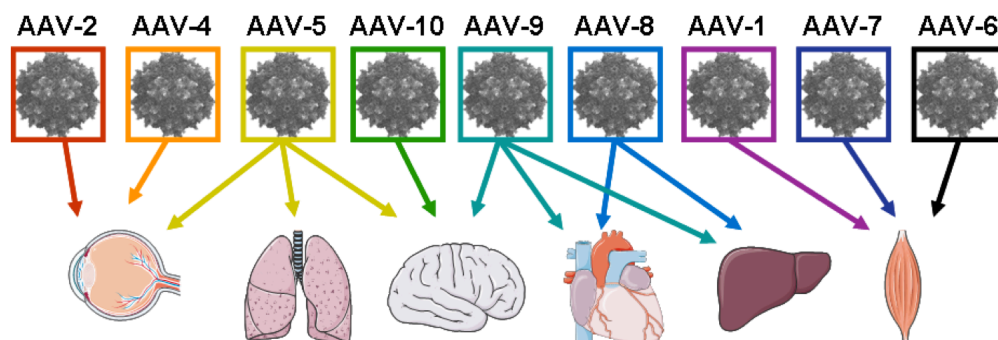


Figure 13. Organes préférentiellement ciblés par les sérotypes d'AAV

Schéma inspiré de (Arruda and Xiao, 2007).

Cependant comme indiqué, ce tropisme n'est pas exclusif et tous les sérotypes d'AAV peuvent infecter une grande variété de tissus, en plus de ceux pour lesquels ils ont un tropisme préférentiel. À ce jour, seulement quelques récepteurs et co-récepteurs ont été découverts (Buning *et al.*, 2008). L'AAV2 entre dans les cellules en se fixant à des molécules d'héparane sulfate et utilise des co-récepteurs comme la laminine, le co-récepteur au facteur de croissance fibroblastique de type 1 (FGFR1) ou encore des intégrines (Daya and Berns, 2008). L'AAV1 ne se lie pas aux héparanes-sulfates et son récepteur n'est pas décrit à ce jour. L'AAV6 est homologue à l'AAV2 avec 83 % d'identité de séquence en a.a et se lie au

même récepteur (Tableau 1). Les sérotypes 4 et 5 utilisent les acides sialiques comme récepteurs avec quelques différences. Le PDGFR (*Platelet-Derived Growth Factor Receptor*) a été identifié comme co-récepteur de l'AAV5 (Di Pasquale *et al.*, 2003). L'AAV8 utiliserait en co-récepteur, le récepteur de la laminine. Les récepteurs de la laminine étant exprimés dans beaucoup de tissus, la présence de ce récepteur pourrait expliquer le large tropisme cellulaire de l'AAV8. Enfin, récemment, le galactose a été identifié comme récepteur pour le l'AAV9 (Bell *et al.*, 2012; Shen *et al.*, 2011). Les récepteurs des autres sérotypes ne sont pas encore décrits.

AAV	% d'identité entre sérotypes d'AAV								
	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-7	AAV-8	AAV-9
AAV-1	100								
AAV-2	83	100							
AAV-3	87	88	100						
AAV-4	63	60	63	100					
AAV-5	58	57	58	53	100				
AAV-6	99	83	87	63	58	100			
AAV-7	85	82	85	63	58	85	100		
AAV-8	84	83	86	63	58	84	88	100	
AAV-9	82	82	84	62	57	82	82	85	100

Tableau 1. Pourcentage d'identité des capsides d'AAV entre les différents sérotypes

Pourcentage calculé sur la séquence en acide aminé de la protéine VP1. Modifié de (Daya and Berns, 2008).

L'AAV est largement distribué dans le monde et infecte les hommes dès l'enfance probablement en même temps que ses virus auxiliaires (Calcedo *et al.*, 2011). En effet, 80 % de la population humaine testée possède des anticorps contre l'AAV2 et environ 20 à 40 % de ces individus possèdent des anticorps neutralisants (Moskalenko *et al.*, 2000). Plusieurs études ont été réalisées à travers le monde afin de déterminer la proportion d'anticorps neutralisants de chaque sérotype au sein de la population humaine. Ainsi, la majorité des anticorps neutralisant l'AAV sont dirigés contre le sérotype 2, le sérotype 1 et enfin le sérotype 6. En revanche, peu d'anticorps neutralisants anti-AAV5, anti-AAV7 et anti-AAV8 sont détectés (Boutin *et al.*, 2010; Calcedo *et al.*, 2009; Halbert *et al.*, 2006). Les séquences d'AAV sont majoritairement retrouvées dans le foie et la rate des hommes et des primates non-humains et souvent plusieurs variants co-existent chez le même individu (Gao *et al.*, 2004). Des études expérimentales réalisées en immunisant des lapins montrent que les anticorps neutralisants dirigés contre les AAV1, AAV2, AAV7 et AAV8 montrent très peu de cross-réactivité entre-eux dans des études expérimentales (Tableau 2) (Gao *et al.*, 2002b). Ainsi, plusieurs injections d'AAV sont effectivement possibles dans des modèles animaux comme la souris, en contournant l'induction d'AcN par un changement de sérotype d'AAV (Wu, Asokan, and Samulski, 2006). Cependant une plus forte cross-réaction existe dans la

population humaine malgré le fait que certains sérotypes ne soient pas ou peu retrouvés chez l'homme. De plus de très faibles taux d'AcN *in vitro* ont été montrés comme capables d'inhiber fortement la transduction des cellules *in vivo* (Boutin *et al.*, 2010; Calcedo *et al.*, 2009; Halbert *et al.*, 2006; Hurlbut *et al.*, 2010; Lin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010). Ces observations ont conduit plusieurs équipes à développer des variants artificiels par modification génétique des capsides (voir Introduction, Chapitre 3.3.4) (Bartel, Schaffer, and Buning, 2011).

AAV	Titration des anticorps anti-sérotipe d'AAV								
	AAV-1	AAV-2	AAV-3	AAV-4	AAV-5	AAV-6	AAV-7	AAV-8	AAV-9
AAV-1	Black	White	White	White	Black	Black	Black	White	White
AAV-2	Black	Black	Black	Black	White	Black	Black	Black	White
AAV-3	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-4	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-5	Black	White	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-6	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-7	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-8	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black
AAV-9	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black	Black

Tableau 2. Anticorps anti-capside d'AAV cross-neutralisants

Des lapins ont été injectés par les différents sérotypes d'AAV. Leur sérum a été prélevé et analysé pour évaluer la réactivité des anticorps anti-capside. La neutralisation et la cross-neutralisation sont mesurées par titration des anticorps neutralisants contre chaque isotype. Noir: titre en >1: 1000, Gris: titre compris entre <1: 1000 et 1: 20, Blanc <1: 20 (Gao *et al.*, 2004).

3.3 LES VECTEURS AAV RECOMBINANTS

De par ses propriétés naturelles, l'AAV a été rapidement utilisé comme vecteur recombinant. En effet, son absence de pathogénicité, la relative simplicité de son organisation génomique et sa capacité à infecter de nombreux types cellulaires ont très vite attiré l'attention des chercheurs, travaillant dans le domaine du transfert de gène, sur ce virus.

Dans ce but, le génome de l'AAV a été modifié afin de pouvoir insérer un gène étranger (Figure 14). Pour cela, les gènes *rep* et *cap* ont été supprimés et remplacés par une cassette d'expression portant : un promoteur, le gène choisi et une séquence polyA. Les seules séquences virales conservées sont les ITR qui sont indispensables pour la réplication et l'encapsidation du génome recombinant au sein des capsides virales. En effet, compte tenu de la petite taille de la capside de l'AAV, la cassette d'expression pouvant être insérée ne peut pas excéder 4,7 kb. Dans les cas des vecteurs AAV recombinants et en absence de protéines Rep, l'intégration du vecteur dans le génome de la cellule est rare et aléatoire, et ce génome reste majoritairement sous une forme épisomale (Vincent-Lacaze *et al.*, 1999).

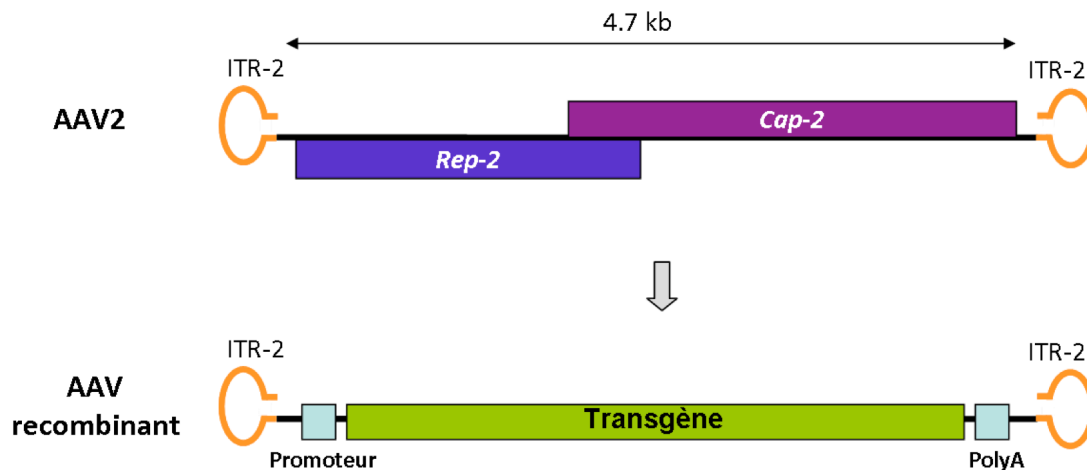


Figure 14. Organisation génomique d'un vecteur AAV recombinant

Les gènes *rep* et *cap* du génome d'AAV2 sauvage sont remplacés par une cassette d'expression portant un promoteur, la séquence codante du gène d'intérêt et une séquence polyA. Les seules séquences virales restantes sont les ITR qui pour la plupart des vecteurs sont issues de l'AAV2.

L'étude de la biologie de ces vecteurs a montré que certaines étapes de leur cheminement dans la cellule infectée semblent limiter l'expression optimale du transgène. De plus, une fois la particule entrée dans la cellule, son cheminement jusqu'au noyau peut être également une étape limitante, tout comme la conversion de l'ADN sb en ADN db, forme transcriptionnellement active, qui constitue une étape critique majeure bloquant la transduction des cellules aussi bien *in vitro* que *in vivo* (Ferrari *et al.*, 1996; Hauck *et al.*, 2004; Thomas *et al.*, 2004).

De nouvelles technologies et de nouveaux concepts ont été développés dans le but de s'affranchir de ces contraintes afin d'augmenter la taille des gènes pouvant être insérés et l'efficacité de la transduction des vecteurs AAVr.

3.3.1 Le « trans-splicing »

La technique de trans-épissage ou « *trans-splicing* » (ts) a été mise au point afin d'augmenter la taille des gènes insérés dans les particules d'AAVr (Figure 15). Cette méthode est basée sur l'utilisation de la conformation des concatémères de l'AAV en « tête à queue » et sur la recombinaison homologue entre deux ITR localisées sur des vecteurs séparés (Duan, Yue, and Engelhardt, 2001). Ainsi, le gène d'intérêt est séparé en deux parties et codé par deux vecteurs AAV portant chacun une séquence donneur / accepteur pour permettre après recombinaison et reconstitution du gène au sein de la cellule co-infectée, la production d'un ARNm avec les ITR reconnues comme un intron. L'épissage de cet ARNm permet alors d'exprimer la protéine d'intérêt.

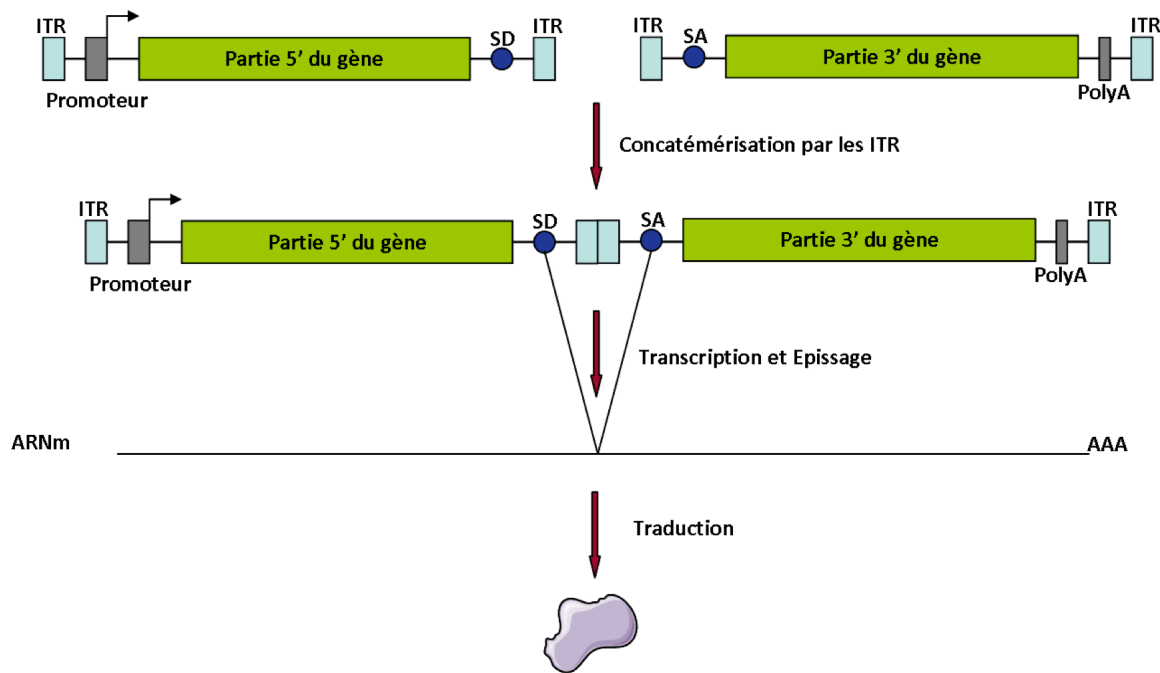


Figure 15. La technique de « trans-splicing »

SD : site donneur, SA : site accepteur. Schéma inspiré de (Daya and Berns, 2008).

Cette technique a été testée par exemple, en utilisant des vecteurs AAVr codant pour la protéine LacZ, pour cibler la rétine (Reich *et al.*, 2003) ou le muscle (Ghosh, Yue, and Duan, 2006). Après la démonstration de son efficacité, cette technique a été utilisée pour insérer des gènes d’une taille supérieure à 6 kb comme par exemple le gène *CFTR* (*Cystic Fibrosis Transmembrane conductance Regulator*) dans des cellules épithéliales pulmonaires ou le gène de la mini dystrophine dans les cellules musculaires chez la souris (Lai *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2005c). Pour que cette technique soit efficace, il est donc nécessaire qu’une même cellule soit co-infectée par les deux vecteurs *in vitro* ou *in vivo*. Les tsAAV demeurent moins efficaces que les vecteurs AAV recombinants traditionnels (Daya and Berns, 2008). Plus récemment, les vecteurs tsAAV ont montré leur potentiel pour être utilisés en thérapie génique pour traiter la cardiomyopathie de Duchenne (Ghosh *et al.*, 2009). Afin d’augmenter leur efficacité, une nouvelle génération de tsAAV a été développée en insérant des séquences complémentaires entre les deux vecteurs, de façon à favoriser la recombinaison homologue (Ghosh *et al.*, 2008).

3.3.2 Les vecteurs AAVr double brin

Pour s’affranchir de l’étape de conversion de l’ADN sb en db, des vecteurs AAVr portant un ADN db ont été développés (Figure 16). Aussi nommés « *self-complementary* » (sc), ces vecteurs ne peuvent transporter que des gènes de 2,3 kb à maximum 3,3 kb

(McCarty, Monahan, and Samulski, 2001; Wu *et al.*, 2007). Les vecteurs AAV db ont montré à de nombreuses reprises leur capacité à exprimer rapidement le transgène par comparaison avec les vecteurs AAV sb aussi bien *in vitro* que *in vivo* et ce, dans de nombreux tissus comme le foie, le muscle, le cerveau et la rétine (Fu *et al.*, 2003; McCarty *et al.*, 2003; McCarty, Monahan, and Samulski, 2001; Wang *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2002).

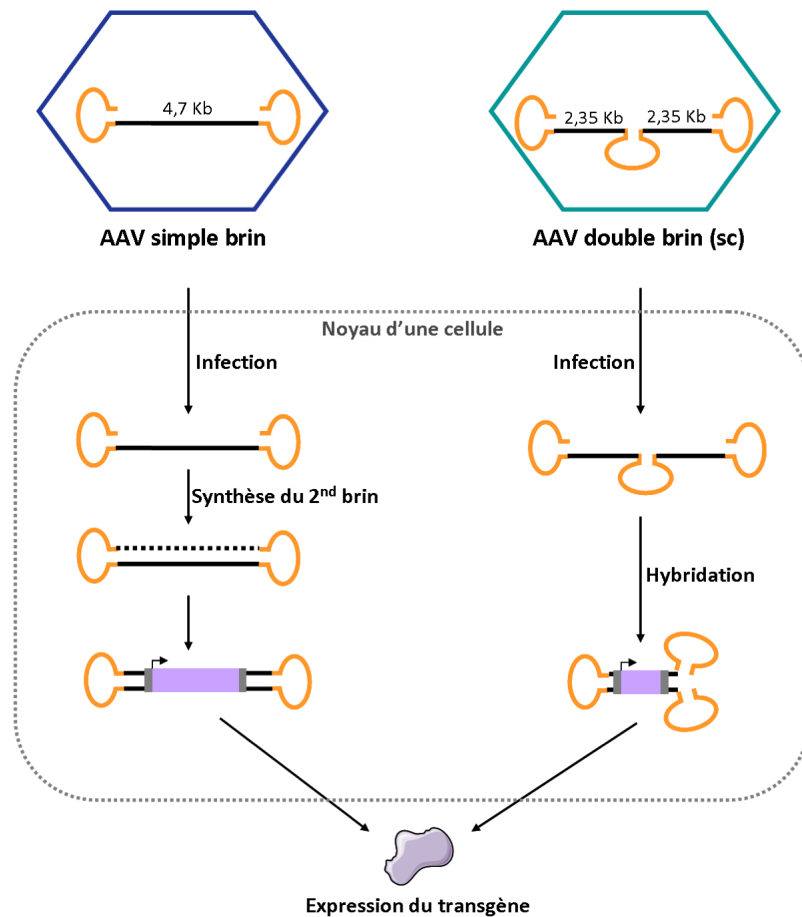


Figure 16. Les vecteurs AAV double brin

Ces vecteurs permettent de s'affranchir de l'étape de synthèse du 2^{ème} brin soit par une polymérase cellulaire soit par l'hybridation de génome simple brin de polarité opposé (non représenté ici). Cette technique permet d'exprimer le transgène plus efficacement et plus rapidement *in vitro* et *in vivo* que le vecteur simple brin.

3.3.3 Les vecteurs AAVr utilisant des capsides modifiées

Comme nous l'avons vu dans la partie précédente, les différents sérotypes d'AAV permettent de cibler préférentiellement certains tissus et utilisent des récepteurs cellulaires uniques. Ainsi, des vecteurs AAV2 ont été développés en encapsidant le génome du vecteur contenant les ITR de ce sérotype dans une capside dérivant d'un autre sérotype afin de cibler préférentiellement un tissu donné (Figure 17A). Ces vecteurs sont aussi parfois

appelés *pseudotypés*. Plusieurs techniques permettant la production de ce type de vecteurs recombinants ont été développées, dont celle que nous utilisons au laboratoire et qui est détaillée dans l'Annexe 2 (Ayuso, Mingozzi, and Bosch, 2010; Buning *et al.*, 2008; Grimm and Kay, 2003b).

3.3.4 Modification de la capside virale

Plusieurs approches ont été développées afin de restreindre ultérieurement le tropisme des vecteurs AAV, ou d'apporter de nouvelles propriétés comme l'échappement aux anticorps neutralisants spécifiques de la capside.

3.3.4.1 Les capsides mosaïques

Une première approche repose sur la génération de capsides mosaïques. Il s'agit de produire un mélange de sous-unités de capsides de différents sérotypes sauvages ou mutants (Figure 17B). Les particules sont générées après transfection de plusieurs gènes de capsides provenant de variants différents lors de la production de vecteurs AAV recombinants. Le ratio des protéines de capsides incorporées dans la particule dépend de la quantité de plasmide auxiliaire (gènes *rep* et *cap*) utilisée pour la transfection. La détermination des conditions optimales pour la préparation de ces capsides mosaïques est extrêmement sensible au moindre changement de conditions expérimentales. De ce fait, il est assez difficile de reproduire les conditions stœchiométriques nécessaires à la production optimale de ce genre de capside. De plus, le fait de mélanger des sous-unités de différents variants peut augmenter la neutralisation des capsides par des anticorps spécifiques des deux variants utilisés. Cette méthode est notamment utilisée pour changer le profil de transduction et combiner les caractéristiques de chaque sérotype utilisé. Par exemple, un mélange de sous-unités de capsides de sérotypes 1 et 2 permet l'obtention d'une particule mosaïque pouvant transduire efficacement le muscle (propriété du sérotype 1) et le foie et capable de se fixer aux héparanes sulfates (propriété du sérotype 2). Un autre exemple, est la combinaison de protéines modifiées de capside de l'AAV2, portant un domaine de liaison à une immunoglobuline (Z34C), avec des protéines de capside de l'AAV2 sauvage. Ces particules sont ainsi capables de se lier aux héparanes sulfates et à des anticorps reconnaissant la partie Z34C de l'immunoglobuline (Buning *et al.*, 2008; Muzyczka and Warrington, 2005; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

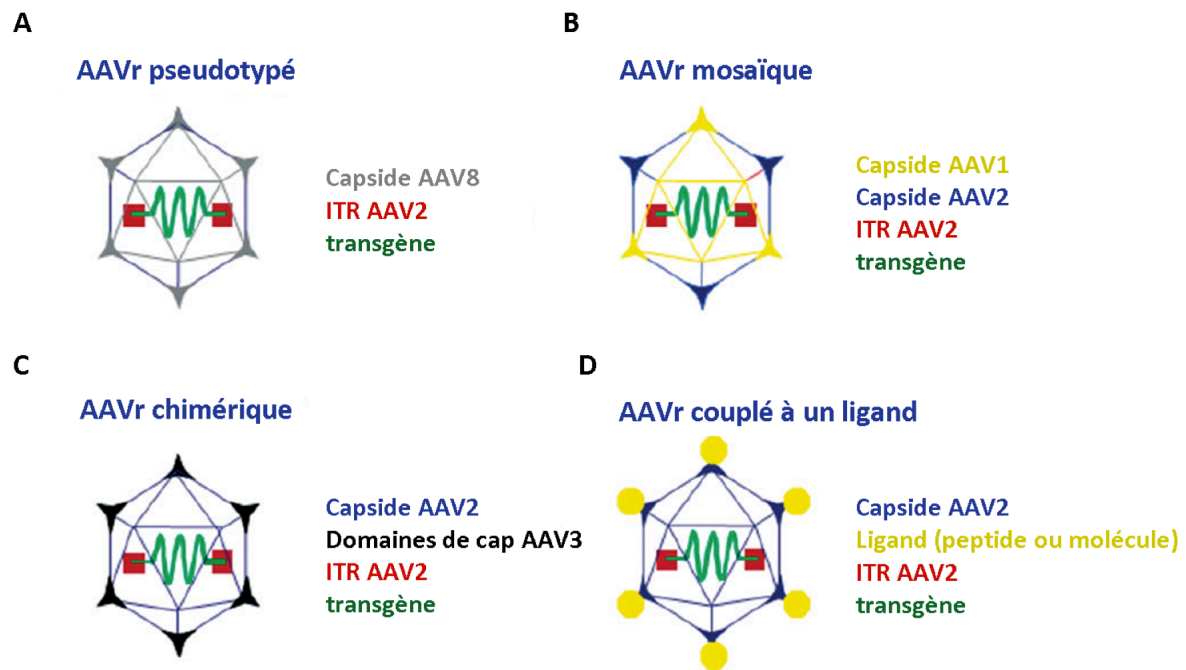


Figure 17. Techniques de modification de la capside virale des vecteurs AAVr

A. La capside de l'AAV2 est remplacée par une capside d'un autre sérotype. **B.** Plusieurs sous-unités de protéines de capsides sont utilisées pour construire une capside mosaïque provenant de plusieurs sérotypes. **C.** Les AAVr chimériques sont composés des protéines de capside de l'AAV2 modifiées génétiquement pour apporter un domaine de capside d'un autre sérotype. **D.** Les particules d'AAV2 recombinant sont couplées à des molécules chimiques ou les sous-unités protéiques sont modifiées sur quelques acides aminés.

3.3.4.2 Les capsides chimériques

Une deuxième approche de modification de la capside repose sur un système de chimérisme (Figure 17C). Le gène de la capside est modifié afin d'échanger un domaine d'un sérotype avec celui provenant d'un autre. Cette stratégie permet par exemple de transférer le domaine de liaison aux héparanes sulfates de l'AAV2 sur la capside d'un AAV5, lui conférant ainsi la capacité de se lier à ce récepteur alors que normalement il en est incapable. Cette modification peut donc entraîner des changements dans le tropisme cellulaire.

En connaissant les domaines impliqués dans les liaisons entre particules d'AAV et le récepteur cellulaire, la spécificité de transduction d'un sérotype peut être modifiée. Par exemple, l'insertion d'un domaine de liaison au récepteur de l'AAV1, sérotype qui transduit préférentiellement le muscle, confère aux particules nouvellement formées la propriété de transduire efficacement les fibres musculaires. Cette stratégie fonctionne encore davantage si le domaine de reconnaissance du récepteur de la capside d'origine est supprimé avant

d'introduire le nouveau domaine (Buning *et al.*, 2008; Muzyczka and Warrington, 2005; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

Les 100 variants d'AAV décrits précédemment, ont été découverts à partir de prélèvements de tissus infectés par des AAV latents. Afin d'augmenter l'efficacité de transduction des vecteurs AAVr, de découvrir de nouveaux sérotypes au tropisme plus spécifique et capable d'échapper aux réponses immunitaires préexistantes, ces variants ont été utilisés afin de développer de nouveaux vecteurs AAVr. Ces vecteurs AAVr aux capsides variées ont été évalués pour leur capacité de production de particules virales et d'infection de cellules *in vitro*. Une grande partie de ces vecteurs AAV dérivés de ces variants ont été dans l'incapacité de produire des particules virales avec un titre convenable. La présence de certaines séquences d'acides aminés serait à l'origine de cette incapacité. C'est pourquoi, certaines modifications des capsides dont la suppression de ces résidus, ont été réalisées. Certains de ces variants modifiés ou non, ont montré une capacité à transduire plus efficacement certains tissus, ouvrant une nouvelle voie vers le développement d'un vecteur cible spécifique. Par exemple, l'AAV9 transduit efficacement le cerveau mais le variant hu.32 (variant humain) transduit quand à lui plus précisément et plus efficacement les astrocytes et les oligodendrocytes (Cearley *et al.*, 2008). De plus, la technique de chimérisme a permis la construction du sérotype rh32.33, sérotype hybride construit *in vitro*, à partir de séquence de capsid rhésus du variant rh.32 et du variant rh.33 (Figure 12A et B) (Vandenberghe *et al.*, 2009). En effet, le variant rh.32 a été modifié par l'insertion d'un fragment homologue du variant rh.33 permettant la suppression de 5 résidus qui avaient un effet négatif sur la production virale et sur l'efficacité de transduction (Vandenberghe *et al.*, 2009). Non seulement ce nouveau sérotype ne montre aucun anticorps neutralisant dans la population humaine, ce qui en fait un sérotype intéressant pour des applications humaines, mais il a également montré sa capacité à induire de fortes réponses cellulaires contre le produit du transgène (Calcedo *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2009).

3.3.4.3 Les capsides couplées à un peptide

La troisième approche consiste à insérer dans la capsid de l'AAV un peptide ou un ligand permettant l'adressage de la capsid à un récepteur donné (Figure 17D). Cette technique est aussi appelée « AAV *targeting vector* ». Pour cela, le gène *cap* est modifié pour accepter une petite séquence de maximum 32 acides aminés. Cette séquence peut être insérée en position N-terminale (N-term) des protéines VP1 et VP2 ou dans la région centrale de VP3. En effet, une insertion en position N-term ou C-terminale (C-term) de la protéine VP3 n'est pas tolérée pour une formation optimale de la capsid virale. Seuls quelques sites peuvent accepter ce genre de modification au risque d'induire un titre viral

faible et un changement de phénotype non souhaité. À ce jour, ces sites sont relativement bien décrits. Comme pour la stratégie montrée précédemment, il est également nécessaire que le domaine ligand du récepteur d'origine soit supprimé afin d'obtenir un re-ciblage total de la nouvelle capside vers le récepteur choisi (Bartel, Schaffer, and Buning, 2011; Buning *et al.*, 2011; Buning *et al.*, 2008; Muzyczka and Warrington, 2005; Wu, Asokan, and Samulski, 2006). Par cette technique, il est aussi possible d'incorporer la protéine luciférase dans la sous-unité VP2, ce qui permet la production de particules d'AAV bioluminescente *in vivo* (Asokan *et al.*, 2008). Cette technique a été récemment améliorée. En effet, il est difficile d'insérer des peptides étrangers dans une capside d'AAV sans altérer la stabilité et l'infectivité des particules. Par ailleurs, seul un nombre limité de peptides capables de cibler un récepteur donné, est connu. Afin d'augmenter le répertoire de variants générés, une librairie de peptides est insérée en position 587 de la séquence du gène *cap* de l'AAV2 puis une librairie de capsides d'AAV2 mutées est constituée. La sélection de ces librairies s'effectue alors *in vitro* ou *in vivo* sur des cellules cibles ou des tissus cibles. Cette technique permet d'obtenir des ligands capables d'infecter des cellules jusqu'à présent non permissives à l'infection par les AAV ou encore de trouver des capsides d'AAV2 mutées et non neutralisées par des anticorps anti-AAV2 ayant une forte prévalence dans la population humaine (Bartel, Schaffer, and Buning, 2011; Buning *et al.*, 2008; Muzyczka and Warrington, 2005; Perabo *et al.*, 2003; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

3.3.4.4 Les capsides couplées à une molécule chimique

Enfin, une dernière stratégie repose sur le couplage des particules virales d'AAV néo-synthétisées à des molécules chimiques ou à des conjugués afin de leur apporter de nouvelles propriétés (Figure 17D). Par exemple, il est possible de fixer des molécules de biotine à la surface des particules d'AAV2 ce qui permet leur purification sur une colonne d'avidine, ou de cibler des cellules exprimant un récepteur fusionné à une étiquette streptavidine. Egalement, des anticorps à double spécificité peuvent être utilisés, fixant spécifiquement d'un côté la particule d'AAV et de l'autre ayant une affinité pour un récepteur cellulaire comme l'intégrine. Cette technique permet de cibler préférentiellement des cellules non permissives. Ces techniques sont principalement utilisées *in vitro* et leur utilisation *in vivo* reste à démontrer (Bartel, Schaffer, and Buning, 2011; Buning *et al.*, 2008; Muzyczka and Warrington, 2005; Wu, Asokan, and Samulski, 2006).

3.4 UTILISATION DES VECTEURS AAVR EN THÉRAPIE GÉNIQUE

Depuis le développement du premier clone issu de l'AAV2, des vecteurs viraux dérivés de ce sérotype, codant notamment pour les gènes *gfp* ou *lacZ*, ont été très vite

étudiés *in vivo* chez la souris et chez d'autres petits animaux. Ces études ont montré que, après une seule injection chez l'animal, ces vecteurs recombinants permettent l'expression forte et stable du transgène (Grimm and Kay, 2003b). En comparaison avec l'utilisation du vecteur Ad, qui induit chez ce même animal, une expression forte du transgène mais à court terme, les vecteurs AAVr sont capables d'exprimer le transgène sur le long terme. Cette diminution d'expression du transgène est provoquée par une réponse immunitaire cellulaire dirigée contre les cellules transduites (voir partie Introduction 2.4). De nombreuses études ont ensuite confirmé le potentiel des vecteurs AAVr à induire l'expression d'un transgène sur le long terme. De plus, l'AAV2 a montré sa capacité à transduire de nombreux tissus comme le foie, le système nerveux central et la rétine, organes touchés dans de nombreuses maladies génétiques. Ces premières études, réalisées sur les animaux, ont montré certaines caractéristiques intéressantes pour l'utilisation des vecteurs AAVr en thérapie génique. En effet, ces vecteurs recombinants peuvent infecter de nombreuses cellules, rester sous une forme épisomale dans le noyau de la cellule infectée et induisent une faible réponse immunitaire innée (Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2003b). À ce jour, aucun traitement contre des maladies génétiques utilisant des vecteurs AAV2 recombinants n'est commercialisé mais plusieurs essais cliniques de phase I, II ou III contre des maladies génétiques acquises ou héréditaires ont été développés avec ces vecteurs AAV (Mingozzi and High, 2011b). En 2012, les essais cliniques de thérapie génique utilisant des vecteurs AAVr représentent environ 5 % de la totalité de ces essais dans le monde contre 24 % avec l'Ad, 6 % avec les vecteurs issus du virus de la Vaccine et 4 % pour les Poxvirus. Une liste complète des essais en cours est disponible sur le site internet : <http://www.abedia.com/wiley/vectors.php>. La majorité de ces études a été réalisée avec l'AAV2, mais suite à la découverte d'autres sérotypes plus efficaces pour transduire spécifiquement certains tissus, de nombreux sérotypes sont en cours d'investigation (Tableau 3). Actuellement, seuls les sérotypes 1 à 9 sont utilisés en essais pré-cliniques (Allocca *et al.*, 2007; Gao *et al.*, 2006; Grimm and Kay, 2003b; Li *et al.*, 2009) et en ce qui concerne les essais cliniques chez l'homme, les vecteurs AAV1, AAV8 et AAVrh.10 sont en cours d'étude (Carter, 2005; Daya and Berns, 2008).

Trois exemples récents illustrent le potentiel de ces vecteurs en thérapie génique.

La mucoviscidose ou CF (*Cystic fibrosis*) est une maladie affectant les épithéliums glandulaires de nombreux organes, et est due à une mutation du gène *CFTR* codant pour une protéine d'un canal ionique, rendu inactif. Le premier organe à développé une déficience est le poumon. Ainsi, des vecteurs AAV2 codant pour cette protéine active ont été administrés directement dans le poumon. Malgré la détection d'une réponse immunitaire contre le vecteur et l'absence de toxicité, une expression faible du transgène a pu être reportée avec une légère amélioration des symptômes (Daya and Berns, 2008).

Maladie	Transgène	Sérotype	Voie d'administration	Essai clinique
Antitrypsine α -1	Alpha 1-Antitrypsine	AAV2, AAV1	I.M	Phase I/II
Syndrome maculaire	sFLT01	AAV2	Intra-vitréenne	Phase I
Alzheimer	NGF	AAV2	Intra-craniale	Phase I/II
Polyarthrite rhumatoïde	TNFR-Fc	AAV2	Intra-articulaire	Phase I
Céroïdes-lipofuscinoses neuronales	CLN2	AAV2	Injection directe intra-craniale	Phase I
Canavan	Aspartoacylase	AAV2	Intra-craniale	Phase I
Mucoviscidose	CFTR	AAV2	Instillation directe dans le sinus ou aerosol ou par bronchoscopie	Phase I/II
Attaque cardiaque	SERCA2a	AAV1	Procédure AECAI	Phase I/II
Hémophilie de type B	Facteur IX	AAV2	I.M et par voie hépatique	Phase I/II
Déficiences en lipoprotéine lipase	LPL	AAV1	I.M	Phase I/II
Amaurose Congénitale de Leber	RPE65	AAV2	Sous rétinien	Phase I/II
Dystrophie musculaire de Duchenne	Microdystrophine	Hybride AAV2/1	I.M	Phase I
Parkinson	AA decarboxylase, GA decarboxylase, Neutrophine	AAV2	Intra-craniale	Phase I/II
Pompe	Alpha-glucosidase	AAV1	Séries d'injections intra-diaphragmatique	Phase I/II

Tableau 3. Résumé des essais cliniques majeurs utilisant des AAVr

Procédure AECAI: Antegrade Epicardial Coronary Artery Infusion, Inspiré de (High and Aubourg, 2011).

L'utilisation d'un AAV2 recombinant a montré son efficacité dans le traitement de l'Amaurose Congénitale de Leber. Cette maladie dégénérative de la rétine est provoquée par un défaut du gène *RPE65* et conduit rapidement à une cécité. L'injection d'un vecteur AAV2 codant pour la protéine RPE65 en sous-rétinien a permis d'améliorer la vision des patients après seulement 15 jours de traitement et est toujours efficace 1 an et demi après l'injection (Mingozzi and High, 2011b; Simonelli *et al.*, 2010).

Les vecteurs AAV ont également été utilisés pour lutter contre l'hémophilie B qui est une maladie engendrée par un défaut du facteur de coagulation IX. De nombreuses thérapies géniques utilisant un AAV2 codant pour ce facteur ont été étudiées et ont montré leur efficacité chez la souris et le chien (Matrai, Chuah, and VandenDriessche, 2010; Sabatino

et al., 2011). Ces vecteurs ont tout d'abord été injectés par voie IM mais sans obtenir d'effet thérapeutique. Le facteur IX étant normalement exprimé par les hépatocytes du foie, l'injection IM utilisée pour produire cette protéine n'était peut-être pas adaptée. Ainsi, une injection de ces vecteurs par voie IV a été privilégiée et a permis d'améliorer l'expression de la protéine. Cependant chez certains patients, une forte dose de vecteurs AAV2 a induit une inflammation du foie, provoquée par des réponses T ciblant les hépatocytes transduits par le vecteur (Manno *et al.*, 2006). Ce phénomène de destruction des cellules transduites suite à une inflammation du foie a été confirmé chez la souris (Breous *et al.*, 2011). Cette thérapie génique a fait face à un dilemme. En effet, la dose permettant une expression efficace du facteur IX correspondait à la dose nécessaire pour induire des réponses T et détruire les cellules transduites. Ces observations ont conduit à un arrêt de ces essais cliniques qui étaient principalement réalisés avec un vecteur AAV2 sb. Plus récemment cependant, un essai réalisé par injection IV d'un vecteur AAV8 db codant pour le facteur IX a permis d'obtenir l'expression de cette protéine chez l'homme à un niveau thérapeutique (Nathwani *et al.*, 2011).

Enfin, des essais cliniques contre la déficience héréditaire en lipoprotéine lipase ont été réalisés récemment avec un vecteur AAV1. Cette maladie provoque une accumulation de lipoprotéines riches en triglycérides dans le sang. Un AAV1 recombinant a permis d'observer une diminution de ces lipoprotéines dans le sang et une diminution d'inflammation du pancréas. Malheureusement, une réponse cellulaire T a été observée contre la capsid de l'AAV1 détruisant les cellules transduites et diminuant le nombre de cellules exprimant la protéine mais l'ajout d'immunosuppresseur a pu inhiber cette réponse (Gaudet *et al.*, 2010).

Compte tenu de toutes les modifications possibles de la capsid, ainsi que des différents sérotypes existants et des multiples voies d'injection, de nombreuses alternatives utilisant des vecteurs AAV en thérapie génique restent à explorer.

3.5 PROBLÈMES LIÉS À L'INJECTION DES VECTEURS AAVr

À ce jour, aucune thérapie génétique utilisant des vecteurs AAVr n'est encore commercialisée dans le monde. En effet, quelques risques demeurent et demandent de plus amples investigations.

3.5.1 Risque d'intégration

L'intégration du virus AAV2 sauvage dans une cellule est dépendante de la présence des protéines Rep. Lors de la phase de latence, une majorité des génomes restent dans le

noyau de la cellule infectée sous une forme épisomale et quelques molécules d'ADN s'intègrent dans le génome de la cellule hôte dans des locus précis (voir Introduction, Chapitre 3.1). Concernant les vecteurs AAVr, de nombreuses études ont évalué le potentiel intégratif de ces génomes modifiés au sein de la cellule infectée (Nakai *et al.*, 2001a; Penaud-Budloo *et al.*, 2008; Schnepf *et al.*, 2003b; Vincent-Lacaze *et al.*, 1999). Quelques études ont noté que les vecteurs AAVr pouvaient s'intégrer dans le génome de la cellule hôte. Ces intégrations semblent avoir lieu dans des zones de cassures de l'ADN génomique (Miller, Petek, and Russell, 2004). Quelques études ont également montré que ces insertions pouvaient entraîner des cancers (Donsante *et al.*, 2007; Donsante *et al.*, 2001). Ces études ont été réalisées, sur une période de 18 mois, chez des souris nouvellement nées, saines ou possédant une déficience génétique. Ce phénomène a été controversé par une autre étude réalisée chez 80 souris adultes injectées par un AAVr et suivies sur une période 18 mois post-injection. Aucune augmentation du nombre de tumeurs n'a été observée par rapport aux souris contrôles non injectées (Li *et al.*, 2010). Ces données sont en accord avec une autre étude réalisée pendant une période de 10 ans sur 30 chiens adultes injectés par des vecteurs AAVr chez lesquels aucune tumeur n'a pu être observée (Nichols *et al.*, 2009).

En conclusion, la majorité des vecteurs AAVr reste sous une forme épisomale dans le noyau de la cellule hôte. Cependant, des insertions génétiques peuvent avoir lieu et être associées à un risque de cancers mais ceci semble dépendant de l'âge des animaux traités et du moment où l'injection des vecteurs AAV est réalisée. De plus, à ce jour, aucun cas de cancer n'a été observé chez les patients ayant reçu des vecteurs AAVr. Il est également important de rappeler que la première injection de vecteurs AAV recombinant chez l'homme a été réalisée en 1999 et que celle réalisée dans le foie a eu lieu en 2001 et qu'aucune pathologie n'a été observée jusqu'à ce jour. De plus, les vecteurs AAVr ont été classés comme étant des vecteurs non intégratifs par le département de la santé américaine (US FDA). De plus amples études sont cependant nécessaires pour évaluer le risque d'insertions génétiques des vecteurs AAVr au sein du génome humain chez des patients plus ou moins jeunes.

3.5.2 Risque de transmission dans les gonades

Après injection des vecteurs AAVr dans un organisme, il est important de déterminer si le vecteur injecté reste localisé au site de l'injection ; s'il n'infecte que la cellule cible ; ou si au contraire il est disséminé dans tout l'organisme. Cette biodistribution dépend énormément de la voie d'injection utilisée. En effet, une injection de vecteur par voie IV entraîne une dissémination des vecteurs dans l'organisme plus importante qu'une injection par voie IM. Un des risques liés à la diffusion du vecteur dans l'organisme est l'infection des

gonades par les vecteurs AAVr. En effet, si les vecteurs AAVr infectent les gonades et qu'ils s'intègrent dans le génome, le vecteur pourra éventuellement être transmis aux descendants et donc se répandre dans la population humaine.

Des études menées chez le lapin ont montré que lors d'une injection de vecteurs AAV2 ou AAV8, par voie IV, les vecteurs sont retrouvés dans les semences de ces animaux mais disparaissent avec le temps, de façon dose dépendante et sérotype indépendant (Favaro *et al.*, 2009; Schuettrumpf *et al.*, 2006). De plus, chez le lapin, il a été montré que les cellules précurseurs des spermatozoïdes sont non permissives à l'infection par les vecteurs AAVr (Arruda *et al.*, 2001). Une injection IM de vecteurs AAV semble également induire la présence des vecteurs AAVr dans les semences chez la souris et le rat mais pas chez le chien. Comme observé pour l'injection par la voie IV, la présence de ces vecteurs diminue dans le temps jusqu'à l'absence de détection des séquences d'ADN dans les semences (Arruda *et al.*, 2001).

L'injection des vecteurs chez l'homme par voie IM ne semble pas affecter les gonades. En revanche, chez l'homme après injection des AAVr par voie IV, des vecteurs sont détectés dans les semences jusqu'à 4 mois après injection puis disparaissent dans le temps, ceci est probablement dû à la dilution de ces vecteurs dans les cellules (High and Aubourg, 2011). Avant de réaliser un traitement par thérapie génique utilisant des vecteurs AAVr, il est conseillé aux patients de sexe masculin de conserver leur sperme dans une banque. Très peu d'informations sur les risques d'insertions des vecteurs AAV dans les ovules sont disponibles, ceci est dû à la difficulté d'obtention des prélèvements. Même si ce risque semble temporaire et minimal, il est important de continuer l'analyse de la présence et de la persistance de ces vecteurs avec des techniques plus sensibles, afin d'être certain qu'aucun vecteur AAVr ne s'est intégré dans les gonades et ne sera transmis aux générations futures.

3.5.3 Réponses immunitaires contre les vecteurs AAVr

L'un des problèmes majeurs des vecteurs viraux est l'induction de réponses immunitaires contre la capside virale. La plupart de ces vecteurs induisent une réponse immunitaire innée avec le développement d'une inflammation au site de l'injection. Cette réaction inflammatoire conduit à l'activation du système immunitaire adaptatif, qui entraîne une réponse humorale avec l'apparition d'anticorps neutralisants et/ou une réponse cellulaire avec l'apparition de cellules T CD8+ cytotoxiques (LTC). Voici un résumé rapide des réponses immunitaires mises en place par l'injection de vecteurs AAVr.

3.5.3.1 Induction de réponses innées

Le système immunitaire inné est composé de cellules qui possèdent à leur surface des récepteurs permettant la détection précoce d'un agent infectieux tel que les virus ou les vecteurs viraux. Très brièvement, ce système repose sur la détection d'un motif moléculaire associé à un pathogène ou PAMP (*Pathogen-Associated Molecular Patterns*) par un récepteur de reconnaissance de motif moléculaire ou PRR (*Pattern Recognition Receptor*). Parmi ces PRR, la famille TLR est la plus spécifique pour la reconnaissance des virus. Ces TLR sont localisés en grande partie à la membrane plasmique ou dans la membrane des endosomes ; les récepteurs de type NOD qui sont des détecteurs cytoplasmiques ; et des hélicases cytoplasmiques antivirales (RIG-1 ou MDA5). Il existe 13 TLR différents, notamment, le TLR3 qui reconnaît de l'ADN ds étranger, les TLR2 et TLR4 qui reconnaissent des glycoprotéines, le TLR7 qui reconnaît de l'ADN ss et le TLR9 qui reconnaît de l'ADN portant des motifs CpG non méthylés. Ces TLR sont localisés à la surface cellulaire de nombreuses cellules présentatrices d'antigène (CPA) comme les DC, les DCp, les macrophages, les cellules B et quelques cellules T (Rogers *et al.*, 2011). Une fois ces récepteurs activés par la reconnaissance d'un motif moléculaire donné, des cascades de signalisation sont activées. En effet, la plupart des TLR activent le facteur MyD88 qui active la voie de signalisation menant à l'activation des facteurs de transcription NF- κ B et des MAP kinases qui régulent l'expression inducible des cytokines inflammatoires comme le TNF (IL-1 ou IL-6 et l'IFN de type I) (Rogers *et al.*, 2011). Ces molécules vont à leur tour aider à l'élimination de l'antigène par le système immunitaire et stimuler la présentation de l'antigène par les molécules du CMH. Ainsi, les CPA tels que les DC migrent par diapédèse vers les organes lymphoïdes cibles, rencontrent les lymphocytes T naïfs et les activent. Il y a alors déclenchement de la réponse immunitaire adaptative qui entraîne la sécrétion de cytokines.

Les vecteurs AAV ne semblent induire qu'une faible réponse immunitaire innée et aucune inflammation significative n'est provoquée par l'injection de ces vecteurs *in vivo* en comparaison avec un vecteur Ad (Zaiss *et al.*, 2002). Cependant une faible réponse immunitaire innée peut être induite par l'intermédiaire du TLR9 localisé dans des endosomes. En effet, les AAVr induisent la production d'IFN de type I dans les DCp *in vitro* et cette production est dépendante de la voie de signalisation TLR9-MyD88 (Zhu, Huang, and Yang, 2009). En effet, il est possible que lorsque les vecteurs AAVr sont rentrés dans une CPA par endocytose, une partie des capsides pourrait être dégradée, résultant ainsi dans la libération du génome viral et son interaction avec le TLR9 (Rogers *et al.*, 2011). De plus, cette voie de signalisation est indispensable pour le développement d'une réponse immunitaire adaptative contre le produit du transgène et contre la capside virale (Zhu, Huang, and Yang, 2009). Cependant, il faut remarquer que les vecteurs AAVr semblent n'infecter que

faiblement les CD et les macrophages, en particulier d'origine humaine, ce qui limiterait l'induction de réponses innées dues à ce genre de reconnaissance par le TLR9. Cependant, en fonction des sérotypes utilisés ou des types de génomes double brin, cette transduction peut être améliorée (Lu and Song, 2009; Veron *et al.*, 2007). Plus récemment, il a été aussi décrit que les vecteurs AAVr pourraient stimuler les réponses innées via une reconnaissance de la capside virale à la surface de la cellule par le TLR2 (Hosel *et al.*, 2012). Ce phénomène qui a été observé avec des cellules hépatiques humaines pourrait aussi contribuer à l'émergence de réponses adaptatives *in vivo*.

Les capsides d'AAV interagissent aussi avec certaines molécules du complément. En effet, la phagocytose des vecteurs AAVr par les macrophages et l'activation des gènes inflammatoires sont augmentés en présence du facteur iC3b *in vitro*, qui est présent à la surface des capsides d'AAV. Ce phénomène a été décrit comme indispensable pour le développement d'anticorps anti-capside d'AAV dans des modèles murins (Zaiss *et al.*, 2008).

3.5.3.2 Induction de réponses adaptatives

La réponse immunitaire adaptative contre l'AAV est composée en grande partie d'une réponse humorale avec le développement d'anticorps neutralisants. Comme nous l'avons vu précédemment, 80 % de la population humaine possède des anticorps contre le sérotype 2 et 30 % contre le sérotype 1 (Calcedo *et al.*, 2009). L'AAV est largement répandu dans le monde et à travers toutes les tranches d'âges de la population. Les anticorps neutralisant développés contre les différentes capsides de l'AAV limitent son utilisation chez l'homme et chez le primate non-humain. En effet, ces anticorps neutralisants diminuent la transduction des particules dans de nombreux organes et chez de nombreuses espèces (Mingozzi and High, 2011a; Zaiss and Muruve, 2008). Cette réponse humorale semble dépendante des cellules T car en inhibant la fonction de ces cellules avec un anticorps ciblant le récepteur CD4, le développement d'anticorps anti-capside n'a pas lieu et le vecteur transduit plus efficacement ces cellules cibles (Chirmule *et al.*, 2000). Plusieurs approches ont été étudiées pour contourner ce problème, comme l'ajout d'un immunosuppresseur chez la souris, la modification des capsides (capside mosaïque ou chimère), ou le changement de sérotype (pseudotypage) (Mingozzi and High, 2011a; Zaiss and Muruve, 2008).

De nombreuses études précliniques chez les animaux ont montré une persistance des vecteurs AAV2 dans le temps et une expression continue de la protéine d'intérêt. Cependant les études cliniques ont mis en évidence une situation plus complexe, en particulier lors de premiers essais dans le traitement de l'hémophilie de type B. En effet, un mois après l'injection IV d'un vecteur AAV2-FIX, des réponses inflammatoires corrélées à une

perte d'expression du transgène ont été observées, en particulier chez des patients injectés avec les plus hautes doses de vecteur (Mingozzi *et al.*, 2007). Il est apparu ensuite que ce phénomène a été provoqué par une forte inflammation du foie et l'apparition de réponses cellulaires LTC dirigés contre la capsid de l'AAV2, qui ont éliminé toutes les cellules transduites. Ces LTC étaient des cellules T CD8+ effectrices mémoires qui avaient été mises en place lors d'une précédente rencontre de l'AAV2 avec ces patients (Mingozzi *et al.*, 2007). De plus, une étude chez l'homme, a montré que des cellules T mémoires dirigées contre le sérotype 2 pouvaient réagir contre des sérotypes d'AAV alternatif (AAV1 et AAV8) (Mingozzi *et al.*, 2007). Comme observé pour les réponses humorales anti-capsides d'AAV, il est fort probable que des réponses cellulaires mémoires pré-existantes, dirigées contre les capsides d'AAV soient mises en place dans une grande partie de la population.

En conclusion, il apparaît que les études réalisées chez les animaux ne peuvent pas être transposées à l'homme chez qui les réponses immunitaires sont très complexes dépendantes de nombreux facteurs comme les voies d'administration, le sérotype utilisé ou encore la dose administrée (Brockstedt *et al.*, 1999; Mingozzi and High, 2011a). Il est vraisemblable que, avec le développement des capsides d'AAV modifiées et une meilleure compréhension de l'induction de la réponse innée et adaptative, les essais de thérapie génique pourront être nettement améliorés.

3.5.4 Risque de réponses immunitaires contre le produit du transgène

Le développement de réponses immunitaires contre le produit du transgène est un phénomène a priori attendu lorsqu'une protéine qui n'est pas présente à l'état de base dans l'organisme hôte est exprimée. Dans ce cas, en effet, le produit du transgène est détecté par le système immunitaire et notamment les CPA qui permettent l'activation des cellules T. La nature de l'antigène, le type de CPA et le microenvironnement déterminent la voie d'activation des cellules T et l'amplitude de la réponse. L'antigène peut être présenté de deux façons aux cellules T. L'antigène peut être produit directement au sein de la CPA après infection de cette cellule et présentation des peptides de l'antigène par les molécules du CMH-I (Figure 18A). Cette voie permet l'activation de cellules LTC. Comme les vecteurs AAV ne transduisent pas efficacement les CD, cette voie n'est que peu envisagée dans la stimulation de cellules LTC dirigés contre le produit du transgène. En revanche, une deuxième voie semble impliquée. Dans ce cas, les CPA captent l'antigène exogène par endocytose ou phagocytose puis des peptides sont présentés par les molécules du CMH-II (Figure 18B). Cette voie stimule les cellules T CD4+ et les lymphocytes B. Cette voie permet également une cross-présentation de l'antigène par les molécules du CMH-I permettant également l'activation des cellules LTC contre l'antigène (Figure 18).

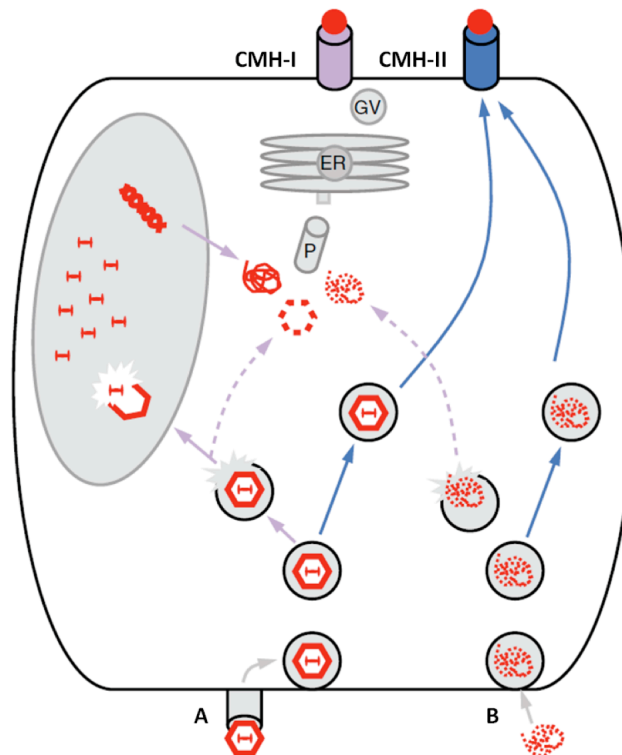


Figure 18. Présentation des antigènes codés par un vecteur AAVr et cross-présentation

A. Le vecteur AAVr transduit une CPA par un récepteur dépendant de l'endocytose. La particule d'AAV sort de la vésicule d'endocytose et se dirige dans le noyau pour produire un antigène endogène. Dans le cytosol, l'antigène produit est pris en charge par le protéasome (P) et dégradé en peptides. Ces peptides entrent dans le réticulum endoplasmique (ER) par le transporteur d'antigène (TAP) puis sont chargés sur le CMH de type I qui va migrer via des vésicules de Golgi (GV) jusqu'à la membrane plasmique. Cette présentation d'antigène est aussi appelée présentation directe. **B.** La phagocytose de cellules transduites ou la capture de l'antigène sécrété permet à la CPA de prendre en charge des peptides exogènes. Ces peptides endocytés sont ensuite chargés sur les CMH de type II. De plus, un antigène exogène peut échapper aux endosomes et être cross-présenté par la voie du CMH-I. Les lignes pleines violettes représentent la voie directe de présentation des peptides aux CMH ; les lignes en pointillés violettes, cross-présentation au CMH-I ; les lignes pleines bleues, la présentation par le CMH-II. Schéma provenant de (Mays and Wilson, 2011).

Chez la souris, il semble que les cellules T CD8+, recrutées au site de l'inflammation par les AAVr, ciblent dans un premier temps le produit du transgène plutôt que la capsid de l'AAV. En revanche, la réponse humorale a lieu contre les deux types d'antigènes (Siders *et al.*, 2009). Plusieurs facteurs influencent l'induction de réponses T contre le produit du transgène, induites par l'injection de vecteurs AAV (Mays and Wilson, 2011).

Un premier élément est constitué par la nature de la protéine exprimée. En effet, de nombreux essais avec des vecteurs AAV-GFP injectés dans des modèles murins montrent que la protéine est exprimée de façon stable et continue dans le temps. En revanche, la synthèse d'une protéine virale comme la protéine HA du virus de la grippe, induit des

réponses humorales et cytotoxiques fortes contre l'antigène (Sarukhan *et al.*, 2001). De plus, la localisation cellulaire du produit du transgène semble aussi jouer un rôle dans l'induction des réponses immunitaires. En effet, un vecteur AAV2 codant pour une protéine LacZ cytoplasmique ou membranaire injecté par voie IM, ne stimule pas les mêmes types de réponses. Dans le cas de la protéine LacZ cytoplasmique, aucune activation des cellules T n'a pu être observée, et l'expression de la protéine reste stable au cours du temps. En revanche, la présence de la protéine LacZ à la membrane cellulaire stimule et active une réponse T spécifique de la protéine LacZ et a conduit à la destruction de ces cellules au cours du temps (Sarukhan *et al.*, 2001).

La voie d'administration des vecteurs semble également jouer un rôle dans les réponses immunitaires contre le produit du transgène. En effet, une administration d'un AAVr par voie IM ou ID/SC semble être associée à une forte réaction du système immunitaire alors qu'après une injection IV, les risques semblent plus faibles avec une tendance à l'induction d'une tolérance contre le produit du transgène (Herzog *et al.*, 1997; Mingozzi *et al.*, 2003; Zaiss *et al.*, 2008). En effet, le foie constitue un microenvironnement anti-inflammatoire, qui tend à diminuer la réponse adaptative mise en place (Rogers *et al.*, 2011). La présence de cellules T régulatrices permet notamment d'établir cette tolérance contre le produit du transgène (Cao *et al.*, 2007). Comme nous le verrons dans le chapitre suivant, un dernier élément critique est la nature de la capside qui peut affecter les réponses T contre le produit du transgène de façon qualitative et quantitative.

Enfin, il est important de considérer également le rôle de l'espèce animale qui, comme nous l'avons vu dans le paragraphe précédent, représente un élément critique pour l'induction de réponses immunitaires.

3.6 POTENTIEL DE L'AAV EN TANT QUE VECTEUR VACCINAL

Depuis seulement quelques années, les vecteurs AAVr sont utilisés en vaccination contre certaines maladies infectieuses. Ces études ont fait émerger quelques caractéristiques des vecteurs AAV en vaccination qui doivent être soulignées.

3.6.1 Réponses obtenues après une primo-injection

Tout d'abord, il semble qu'une seule injection de vecteurs AAVr soit suffisante pour permettre le développement d'une réponse humorale et cellulaire contre le produit du transgène.

En effet, après une injection de vecteurs AAV chez l'animal, une réponse anticorps de type IgG (Immunoglobuline de type G) dirigée contre l'antigène se développe environ 1 mois après immunisation, pour atteindre un maximum à 3 ou 4 mois après injection (Du *et al.*, 2006; Kuck *et al.*, 2006b; Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a; Manning *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b). Des anticorps neutralisants spécifiques de l'antigène sont également détectés et apparaissent généralement en même temps que les IgG, et suivent bien souvent le même développement (Du *et al.*, 2006; Kuck *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2005b). De façon intéressante, les vecteur AAVr peuvent aussi induire une réponse immunitaire au niveau des muqueuses avec l'apparition d'IgG et d'IgA spécifique de l'antigène (Kuck *et al.*, 2006b; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b).

En parallèle de la réponse humorale, une réponse cellulaire est mise en place mais le plus souvent, seule la réponse T CD8+ a été analysée. Cette réponse T CD8+ spécifique de l'antigène atteint un maximum entre 2 et 4 semaines après l'injection puis diminue au cours du temps pour atteindre une phase de contraction vers la semaine 9 (Johnson *et al.*, 2005a; Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b; Xin *et al.*, 2002). Ces cellules T CD8+ sont majoritairement des LTC capables de produire de l'IFN γ et de détruire les cellules exprimant l'antigène (Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b; Liu *et al.*, 2000; Manning *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b).

Quelques équipes ont analysé les anticorps neutralisants ou non, dirigés contre la capsid virale. Elles ont démontré une nouvelle fois qu'une seule injection de vecteur d'un sérotype donné, ou la pré-existence de ces anticorps capsid-spécifiques dans l'organisme, peut diminuer l'efficacité d'une réinjection de vecteurs AAV du même sérotype que celui utilisé lors de la première injection (Kuck *et al.*, 2006b; Nieto *et al.*, 2009; Nieto *et al.*, 2012; Xin *et al.*, 2001b).

3.6.2 Effet de la voie d'injection et de la dose de vecteurs

Concernant la voie d'injection, une seule étude a comparé l'influence des voies d'administration sur le développement des réponses humorales et cellulaires (Xin *et al.*, 2001b). La voie d'injection IM permet d'obtenir la réponse anticorps systémique la plus forte, comparée aux voies IN, SC et intrapéritonéale (IP). Cette réponse systémique se développe et atteint son maximum environ 2 à 3 mois après injection puis diminue progressivement pendant au moins 10 mois chez la souris. Cette présence continue d'anticorps spécifiques de l'antigène pendant une longue période a également été observée dans d'autres études (Kuck *et al.*, 2006b; Lin *et al.*, 2007a; Liu *et al.*, 2005b; Manning *et al.*, 1997). En revanche, une injection de vecteurs AAVr par voie orale n'induit pas la même cinétique de réponse immunitaire que les autres voies d'injection présentées. En effet, pour

cette voie, une réponse humorale contre l'antigène se développe un mois après injection, atteint un pic 2 mois après, puis chute rapidement pour atteindre un niveau basal 4 mois après l'injection (Xin *et al.*, 2002). Aucune différence majeure n'a été observée concernant l'induction de la réponse cellulaire contre l'antigène entre ces quatre voies d'injection. De plus, une réponse cellulaire plus importante dirigée contre la capsid de l'AAV a été notée pour l'injection du vecteur par la voie IM. Egalement, la voie d'injection permet de cibler une immunité de type systémique ou muqueuse. En effet, suivant le type de pathogène ciblé, la muqueuse peut être un site plus privilégié pour induire une protection plus efficace. Dans ce cas, une injection IN ou orale est privilégiée (Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b).

Concernant la dose de vecteurs AAVr efficace pour induire des réponses humorales et cellulaires, il semble que, plus la dose de vecteur utilisée est forte, plus la réponse humorale augmente (Manning *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b). Pour la réponse cellulaire, peu de données sont disponibles mais une étude montre que des vecteurs codant pour la protéine Gag du HIV induisent une forte réponse cellulaire avec une dose de 1.10^{11} particules par animal. Seul l'impact de la dose sur la quantité de cellules T CD8+ antigènes spécifiques sécrétant de l'IFN γ a été analysée (Lin *et al.*, 2007b). Ainsi, toutes les études de vaccination ayant eu lieu chez la souris ont été réalisées avec des doses de vecteurs AAVr variant de 1.10^{10} gp à 2.10^{11} gp (particules de génome) par animal. Les quelques études de vaccination réalisées chez le macaque ont été réalisées avec une dose d'environ 1.10^{13} gp par animal.

3.6.3 Effet des différents sérotypes d'AAV

Le sérotype d'AAV choisi joue également un rôle très important dans le type de réponses immunitaires développées. En effet, de nombreuses études de vaccination chez la souris ont été réalisées avec l'AAV2 (Du *et al.*, 2006; Du *et al.*, 2008; Johnson *et al.*, 2005a; Liu *et al.*, 2005b; Liu *et al.*, 2000; Manning *et al.*, 1997; Sipo *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b). Cependant, comme nous l'avons vu précédemment, d'autres sérotypes d'AAV permettent de transduire plus efficacement certains tissus et induisent une production d'antigène supérieure à celle observée avec l'AAV2. Quelques études ont comparé les différents sérotypes d'AAV en suivant leur capacité à induire une réponse immunitaire face à un antigène donné. Notamment, un vecteur AAV1 codant pour une protéine E7 du virus HPV et injectée par voie IM, induit des réponses LTC beaucoup plus efficace que le sérotype 2 (Zhou *et al.*, 2010). Il est important de souligner que le niveau de transduction ne suffit pas à expliquer le niveau des réponses immunitaires observées. En effet, les sérotypes 1 et 7 transduisent tous les deux très efficacement le tissu musculaire mais les réponses immunitaires développées par l'AAV1 sont très inférieures à celles développées par l'AAV7

(Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b; Xin *et al.*, 2006). De plus, le sérotype AAV8, permet d'obtenir une réponse humorale supérieure aux sérotypes AAV1, AAV7 et AAV9 et une réponse cellulaire équivalente au sérotype AAV7 (Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b). De plus, l'AAV5 semble être le sérotype le plus efficace pour transduire des CD murines ou humaines et induire leur maturation *in vitro*. Ainsi, l'injection par voie IM du vecteur AAV5 portant le gène *env* du HIV a été décrit comme permettant l'obtention des meilleures réponses humorales et cellulaires comparé aux vecteurs AAV1 et AAV7 ciblant préférentiellement les cellules musculaires (Xin *et al.*, 2006). En revanche, en ce qui concerne l'injection des vecteurs par voie IN, le sérotype 9 semble mieux adapté que le sérotype 5. Il est important de souligner que le sérotype 8 par voie IN n'a induit aucune réponse immunitaire (Nieto *et al.*, 2009).

3.6.4 Comparaison avec d'autres modes de vaccination et effets d'adjuvants

Les réponses immunitaires développées par les vecteurs AAV ont été comparées à d'autres techniques de vaccination. Ainsi, un vecteur AAVr est plus efficace pour induire une réponse humorale forte et stable dans le temps que l'injection d'un plasmide codant pour la même protéine ou l'injection de la protéine (Liu *et al.*, 2005b; Manning *et al.*, 1997). En revanche, les vecteurs AAVr ne sont pas plus efficace que des VLP-HPV pour induire une réponse humorale (Liu *et al.*, 2005b). Cette observation est à nuancer par une autre étude montrant qu'une seule injection de vecteurs AAVr permet d'induire une réponse IgG systémique et une réponse mucoale plus importante que l'utilisation de VLP-HPV (Kuck *et al.*, 2006b). De plus, ce dernier point est en corrélation avec une autre expérience montrant la supériorité des vecteurs AAVr sur les VLP-HPV pour l'induction d'une réponse immunitaire humorale (Nieto *et al.*, 2009). Enfin, une seule injection de vecteurs AAVr permet d'obtenir des réponses IgG et AcN plus importantes que celles obtenues après vaccination avec un virus SRAS inactivé mais moins forte que ce même virus SRAS inactivé couplé à un adjuvant (Du *et al.*, 2006).

Certaines équipes ont tenté de stimuler les réponses humorales et cellulaires par l'ajout d'un adjuvant. La réponse IgG antigène-spécifique semble être stimulée par l'ajout d'adjuvant mais aucun effet majeur n'a été observé sur les réponses cellulaires. De plus, chaque sérotype ne semble pas fonctionner de la même façon face à un adjuvant donné (Lin *et al.*, 2007b; Nieto *et al.*, 2009).

3.6.5 Effet d'un rappel sur la réponse humorale induite par l'AAV

Plusieurs équipes se sont intéressées à des conditions expérimentales utilisant de multiples injections de vecteurs AAV, ou une stimulation des réponses par un autre vecteur. Pour ce type d'étude, plusieurs facteurs sont à prendre en compte, comme le type de vecteur utilisé pour la seconde ou troisième injection et le délai d'attente entre chaque injection.

Quelques études se sont consacrées à l'analyse des réponses humorales et cellulaires seulement après la réalisation des multiples injections de vecteurs AAV à des temps très rapprochés (Sipo *et al.*, 2010; Xin *et al.*, 2006). Ainsi, les réponses immunitaires obtenues avant et après injection n'ont malheureusement pas pu être comparées entre elles. En revanche, il a été montré que deux ou trois injections réalisées avec un vecteur AAV homologue permettent d'augmenter légèrement la réponse humorale. En effet, lorsque de multiples injections sont réalisées, la réponse IgG semble supérieure, mais pas la réponse AcN (Du *et al.*, 2006; Kuck *et al.*, 2006b; Xin *et al.*, 2001b). Une seule étude a noté une absence de stimulation de la réponse humorale face à des multiples injections de vecteurs AAV, probablement à cause du délai entre ces deux injections (Johnson *et al.*, 2005a).

Cependant, la majorité des études ont utilisé en seconde immunisation, un autre vecteur viral ou un autre mode de vaccination pour stimuler les réponses immunitaires contre l'antigène. Ces études ont montré qu'une deuxième injection de vecteurs AAV de même sérotype est moins efficace qu'une seconde stimulation par des peptides (Du *et al.*, 2008). En revanche, une seconde injection réalisée par un vecteur Ad permet de stimuler la réponse humorale mais pas la réponse cellulaire T CD8+ (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b).

3.6.6 Effet d'un rappel sur la réponse cellulaire induite par l'AAV

Lors de la première injection de vecteurs AAVr de sérotype 7 ou 8, des cellules T CD8+ spécifiques de l'antigène ont été observées. Ces cellules sont fonctionnelles de par leur capacité à détruire les cellules exprimant l'antigène et de par leur capacité à produire de l'IFN γ . Cependant, en analysant la proportion de cellules T effectrices (TE) ; de cellules T effectrices mémoires (TEM) et de cellules T mémoires centrales (TCM), il est apparu que le sérotype 8 induit majoritairement des cellules TE et très peu de cellules TEM comparé à un vecteur Ad (Lin *et al.*, 2007a). Lors de la seconde injection réalisée avec un vecteur Ad, les cellules T CD8+ n'ont pas été restimulées et ne se sont pas multipliées. De plus, des marqueurs d'épuisement cellulaire tels que les molécules PD-1 et le CD244 ont été observés. L'utilisation d'un vecteur AAV8 en deuxième injection plutôt que le vecteur Ad n'a permis

qu'une légère augmentation de la réponse cellulaire (Lin *et al.*, 2007a). Une des hypothèses avancée dans cette étude, mentionne le fait que l'AAV8 (comme l'AAV7) induirait un épuisement cellulaire, dû à une production continue de l'antigène, qui au contact des cellules T CD8+, conduirait à leur épuisement. Cette hypothèse s'appuie sur l'observation que le vecteur AAV8 persiste et est toujours détecté 6 mois après l'injection. Ainsi, après un transfert de cellules T CD8+ dans un environnement naïf dans lequel aucun antigène n'est présent, ces cellules peuvent être efficacement réactivées suite à une re-stimulation. D'autres sérotypes d'AAV seraient plus aptes à induire des réponses T CD8+ fonctionnelles. Ainsi, l'injection du vecteur hybride AAVrh32.33 induit une réponse T CD8+ forte avec présence de cellules TE et TEM en grande quantité. Ce vecteur persiste également, beaucoup moins longtemps dans l'organisme et les cellules T CD8+ sont restimulées efficacement lors d'une seconde injection de vecteur Ad. De plus, cet effet d'épuisement de la réponse immunitaire n'a pas été observé pour la réponse humorale (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a; Lin *et al.*, 2007b).

3.6.7 Vaccination AAV et immunité protectrice anti-virale

L'un des éléments les plus importants et encore peu étudié concerne la capacité des vecteurs AAVr à induire une immunité protectrice et en particulier contre une infection virale. En effet, les vecteurs AAVr sont capables d'induire des réponses humorales et cellulaires fortes contre le produit du transgène mais cette protection n'a pas été mise à l'épreuve lors d'une infection virale par le pathogène ciblé. Seules quelques études ont abordé ce point, et la plupart ont été réalisées chez la souris dans un modèle expérimental d'infection avec le virus de la grippe. En particulier, une étude de protection a porté sur le virus de la grippe qui induit une forte mortalité chez la souris. Un vecteur AAV2 codant pour la protéine HA du virus de la grippe a été injecté par voie IM à des souris, puis deux mois plus tard, les animaux ont été infectés par une dose mortelle de virus de la grippe et 75 % des animaux ont survécu à cette infection. Il faut noter que l'infection a été effectuée au sommet de la réponse anticorps (Xin *et al.*, 2001b). De même, une étude plus récente montre que l'injection de vecteurs AAV codant pour trois antigènes viraux permettrait de protéger les animaux contre une infection par le virus de la grippe homologue mais plus faiblement contre une souche hétérologue (Sipo *et al.*, 2010). De façon intéressante, une autre étude utilisant le virus de la grippe a montré une protection chez la souris aussi bien après une vaccination par l'AAVrh32.33 que par l'AAV8, indiquant ainsi que malgré leur capacité différente à induire une réponse cellulaire mémoire, une seule injection de ces deux vecteurs suffit à conférer un pouvoir protecteur (Lin *et al.*, 2009). Cependant, dans toutes ces études, seulement deux aspects de la protection sont analysés, à savoir, le nombre d'animaux ayant survécu ou la réplication du virus. Ces deux paramètres analysés ne

permettent pas de s'assurer que l'infection virale est totalement contrôlée et que le virus est éliminé de l'organisme.

Seulement deux études ont examiné la propriété des vecteurs AAVr comme vaccins thérapeutiques. Les résultats montrent qu'une seule injection de vecteurs AAVr par voie IM permet de diminuer le volume des tumeurs chez la souris et de protéger partiellement ou totalement ces animaux (Liu *et al.*, 2000; Zhou *et al.*, 2010). Egalement, seulement deux modèles animaux ont été utilisés pour ces études de vaccination ; la souris et le macaque. Les mêmes types de réponses humorales et cellulaires ont été observés et notamment l'absence de restimulation des cellules T CD8+ suite à l'injection d'un vecteur AAV8 et d'une seconde injection de vecteur Ad. Ces phénomènes n'ont pas été observés en utilisant un vecteur AAVrh32.33 en première injection (Lin *et al.*, 2009).

4. LES HÉNIPAVIRUS

4.1 DÉCOUVERTE DES HÉNIPAVIRUS

4.1.1 Le virus Hendra

En septembre 1994, des problèmes respiratoires sévères ont été observés chez des chevaux et des hommes dans une écurie située dans la banlieue de Hendra à Brisbane en Australie (Murray *et al.*, 1995a; Selvey *et al.*, 1995). Après que tous les tests diagnostiques possibles aient été effectués sans succès, et dans le but d'identifier le virus responsable de cette épidémie, des prélèvements de tissus de chevaux et d'hommes infectés ont été placés en culture sur des cellules Véro *in vitro*. Cette expérience a permis de mettre en évidence la présence d'un virus capable d'induire la formation de cellules géantes multinuclées ou syncytia. Ce virus a été identifié comme étant un membre de la famille des *Paramyxoviridae* compte tenu de la structure de la nucléocapside présente dans le noyau des cellules infectées observée par microscopie électronique. De plus, après séquençage, ce virus a été attribué au genre des *Morbillivirus* malgré une faible identité de séquence avec les autres virus appartenant au même genre viral (Murray *et al.*, 1995b). Dans un premier temps, le virus a été nommé Morbillivirus Équin ou EMV (*Equine Morbillivirus*) puis renommé comme étant le virus Hendra (HeV) après reclassification. L'épidémie de 1994 a touché 21 chevaux dont 14 n'ont pas survécu à l'infection. Les 7 chevaux restant, qui présentaient des signes cliniques ont été euthanasiés par souci sanitaire. Deux personnes travaillant dans l'écurie ont également été contaminées, l'une étant décédée quelques jours après l'infection et

l'autre ayant succombé 13 mois après avoir développé quelques symptômes (Murray *et al.*, 1995a; O'Sullivan *et al.*, 1997; Selvey *et al.*, 1995).

4.1.2 Le virus Nipah

La péninsule malaisienne, située en Asie du sud-est, est entourée au nord par la Thaïlande et au sud par la république de Singapour. Cette région connaît de façon récurrente de nombreuses épidémies virales qui induisent des encéphalites provoquées notamment par le CMV, le MV, l'HSV et pour une majorité des cas, le virus de l'Encéphalite Japonaise (JEV) (Cardosa, Hooi, and Kaur, 1995; Mackenzie, 2005; Sinniah, 1989).

En septembre 1998 dans la ville d'Ipoh, située dans la région de Perak en Malaisie, de nombreux éleveurs de porcs ont manifesté des symptômes d'encéphalite aiguë accompagnée d'une forte mortalité (Figure 19) (Chua *et al.*, 1999). Au même moment et dans la même région, des porcs ont également développé des symptômes d'encéphalite ainsi que des problèmes respiratoires. Les autorités malaisiennes ont tout d'abord supposé que l'épidémie était due au virus JEV, se transmettant par les moustiques et qui touche annuellement ce pays. Malgré la mise en place de mesures sanitaires adéquates comme la



Figure 19. Dissémination du virus Nipah en Malaisie de septembre 1998 à mai 1999

vaccination de la population et les campagnes de démoustication, cette épidémie s'est propagée jusqu'à la ville de Sikimat, située plus au sud dans la péninsule, en décembre 1998 (Cardosa, Hooi, and Kaur, 1995; Chong *et al.*, 2001a). En février 1999, des symptômes similaires à ceux observés dans la ville d'Ipoh et Sikimat, ont été rapportés dans les villages de Sungai Nipah et de Bukit Pelandok situés dans la région du Negeri Sembilan (Figure 19). Dans cette région, l'agriculture porcine est très développée et la propagation de l'épidémie a rapidement été associée aux mouvements des élevages de porcs. En mars 1999, la ville de Singapour a été à son tour touchée par cette épidémie avec 11 cas humains dont un décès, tous travaillant dans les abattoirs porcins qui recevaient de la marchandise en provenance de Malaisie (Centers for Disease Control and Prevention, 1999a).

Par la suite, en mai 1999, plusieurs personnes ont été contaminées dans la région du Selangor, région plus centrale de la Malaisie (Figure 19). Le gouvernement malaisien a alors rapidement stoppé tout déplacement de porcs et l'épidémie a pu être enrayée par l'euthanasie de plus d'un million de ces animaux à travers tout le pays. Ceci a d'ailleurs engendré une crise économique majeure (Chua *et al.*, 2000a). De 1998 à 1999, cette épidémie a provoqué des encéphalites aiguës chez 265 personnes, dont 105 n'ont pas survécu à l'infection (Figure 19).

Les symptômes observés lors des nombreuses épidémies ainsi que l'âge des populations touchées, la forte mortalité et l'absence d'effets lors des campagnes de vaccination contre le JEV, ont alerté les autorités et les scientifiques qui ont exclu le virus JEV comme étant la cause de ces épidémies (Chua *et al.*, 1999). Dans le but de déterminer l'agent pathogène responsable, de nombreux prélèvements ont été effectués sur les patients infectés. En mars 1999, un nouveau virus a été isolé d'un prélèvement de liquide cébrospinal issu d'un patient contaminé. C'est alors que les scientifiques lui ont donné le nom de virus Nipah (NiV), en référence au village Sungai Nipah où vivait ce patient (Chua *et al.*, 1999). L'analyse du prélèvement par microscopie électronique a permis d'établir que ce virus appartenait à la famille des *Paramyxoviridae* et un génotypage a montré que ce virus était très proche du virus HeV (Chow *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 1999). Les épidémies du virus NiV en Malaisie ont été associées à un taux de mortalité de 40 % mais ce pourcentage a probablement été sous-évalué du fait de l'absence d'une définition précise de signes cliniques clairement.

4.2 RÉSERVOIR NATUREL ET ÉMERGENCE DES HÉNIPAVIRUS

4.2.1 La chauve-souris, un hôte pour les Hénipavirus

Après la découverte de ces virus émergents, le CDC (*Center for Disease Control*) a recherché la source de ces épidémies. La première étape a été de déterminer les animaux vecteurs de la maladie, autrement dit, les animaux capables de disséminer ces virus jusqu'à l'homme. Concernant le virus HeV, le cheval a été décrit comme étant un vecteur potentiel. De plus, plusieurs études épidémiologiques ont permis d'identifier le porc comme vecteur des épidémies du virus de NiV mais n'ont pas permis de déterminer le réservoir naturel de ce virus (Parashar *et al.*, 2000). Un hôte est considéré comme réservoir naturel lorsqu'il est capable d'accueillir un pathogène sans que celui-ci n'induit de pathologie, ou n'induit une maladie asymptomatique ou non létale, pour ensuite disséminer ce pathogène autour de lui.

Pour le virus HeV, de nombreuses études ont montré que l'hôte naturel de ce dernier est une espèce de chauve-souris frugivore du genre des *Pteropus*, dont notamment l'espèce *Pteropus alecto* (Figure 20A). Des anticorps neutralisants dirigés contre le virus HeV ont été détectés chez 25 % de ces animaux vivant en Australie. De plus, le virus HeV a été isolé de prélèvements issus de chauves-souris, confirmant que ces animaux sont des hôtes naturels (Halpin *et al.*, 2000; Williamson *et al.*, 1998; Young *et al.*, 1996).



Figure 20. Chauves-souris frugivores *Pteropus*, hôtes naturels des virus Nipah et Hendra

A. Renards volants noirs ou *Pteropus alecto* en Australie. **B.** Petites roussettes ou *Pteropus hypomelanus* sur l'île de Pulau Tioman en Malaisie. **C.** Grands renards volants ou *Pteropus vampyrus*.

La grande proximité génétique des virus HeV et NiV, a suggéré que les chauves-souris pouvaient également être l'hôte naturel de ces derniers. En effet, une étude menée sur 14 espèces différentes de chauve-souris frugivores et insectivores vivant sur la péninsule malaisienne a montré la présence d'anticorps anti-NiV, principalement chez les chauves-souris *Pteropus hypomelanus* aussi appelée « Petite roussette » (*Island flying fox*), et chez les

chauves souris *Pteropus vampyrus* plus communément nommées « Roussette de Malaisie » ou « Grand renard volant » (Figure 20B et C) (Yob *et al.*, 2001). Le virus NiV a été isolé un an plus tard à partir d'un prélèvement d'urine de chauve-souris Petite roussette, et a également été retrouvé sur un échantillon de fruit partiellement mangé (Chua *et al.*, 2002; Rahman *et al.*, 2010).

Ces résultats ont permis d'identifier les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* comme le réservoir naturel de ces deux virus émergents. Il est important de noter que les chauves-souris *P.vampyrus* sont des animaux migratoires capables de parcourir de grandes distances et pourraient donc être à l'origine de nouvelles épidémies chez d'autres pays dans les années futures. De plus, une étude récente a permis la détection de nouveaux Paramyxovirus proches phylogénétiquement de virus pathogènes identifiés dans des espèces de chauves-souris à travers le monde. Ainsi, 19 virus très proches des virus NiV et HeV répertoriés dans le genre *Henipavirus*, ont été identifiés dans plusieurs régions de l'Afrique. Il n'est donc pas à exclure que, dans les prochaines années, un de ces nouveaux virus apparaissent dans la population africaine (Drexler *et al.*, 2012). De plus, il est également possible que d'autres espèces animales puissent également être des réservoirs naturels pour ces virus.

4.2.2 Emergence des Hénipavirus

Les causes de l'émergence de ces virus peuvent être multiples. En effet, l'évolution naturelle des espèces entraîne inexorablement l'évolution des virus avec lesquels elles co-évoluent. Ces virus sont, soit des virus émergents issus de phénomènes de recombinaison, soit des virus qui étaient déjà présents depuis de nombreuses années et n'avaient pas encore eu l'occasion de rencontrer l'homme. L'activité humaine ainsi que les changements de climats peuvent favoriser cette émergence, comme c'est le cas pour le virus NiV. En effet, durant ces dernières décennies, la déforestation industrielle ainsi que le phénomène « *El Nino Southern Oscillation* » (ENSO), qui a provoqué une grande sécheresse en Malaisie entre 1997 et 1998, ont entraîné un déplacement des populations de chauves-souris vers de nouvelles zones habitables proches des sources de nourritures. Ainsi, de nombreux foyers de chauves-souris ont été recensés à proximité des vergers agricoles et des élevages de porcs, ce qui a probablement favorisé l'apparition de ce nouveau virus (Figure 22) (Chua, 2003).

4.3 ÉPIDÉMIES RECENSÉES, ÉPIDÉMILOGIE ET SYMPTÔMES

4.3.1 Épidémies

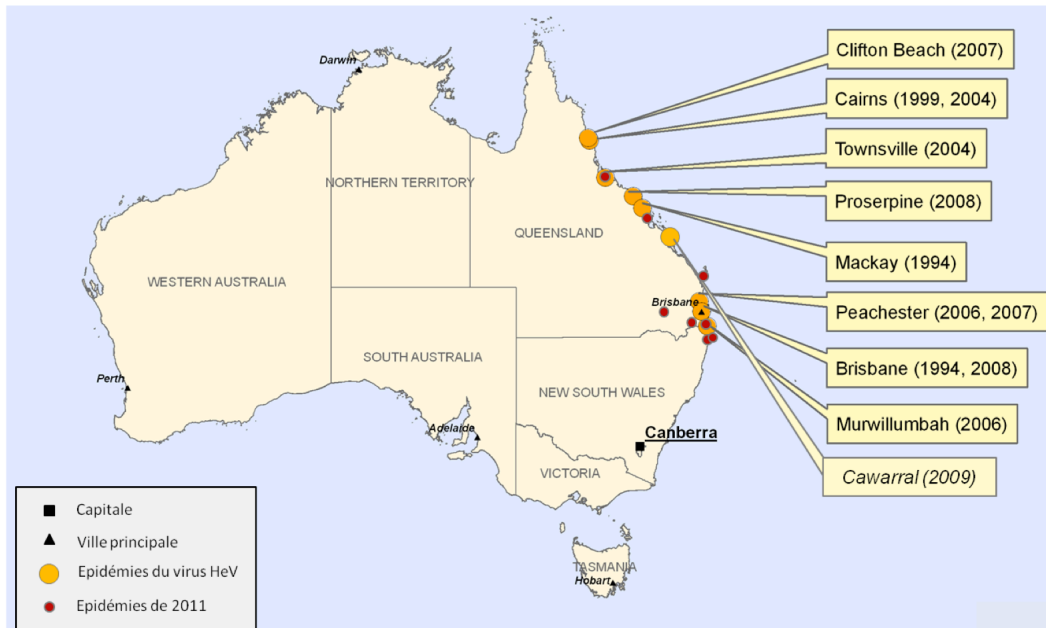
4.3.1.1 Épidémies du virus HeV

À ce jour, de nombreuses épidémies de virus HeV ont été observées et répertoriées en Australie, en particulier dans le Queensland (13) et dans le Murwillumbah (1). En 2011, 18 épidémies localisées dans ces deux régions ont également été recensées (Figure 21A) (Marsh and Wang, 2012; Pallister *et al.*, 2011a). Ainsi, chaque année de nouvelles épidémies impliquant le virus HeV sont recensées mais ne touchent que très peu d'animaux dans diverses régions du Queensland et du Murwillumbah et de rares cas humains ont été répertoriés. Il est important de noter que malgré le faible nombre d'animaux atteints, les taux de mortalité restent très importants. Un des problèmes majeurs entraîné par ces épidémies chez les chevaux est le coût économique qu'elles représentent. En effet, la mort des chevaux destinés à la course représente un manque à gagner important pour leurs propriétaires.

4.3.1.2 Épidémies du virus NiV

Après l'épidémie de 1999 en Malaisie, aucune autre épidémie n'a été recensée dans cette région. En revanche, de nombreuses épidémies sont apparues en Inde et au Bangladesh. En février 2001, dans la ville du Siliguri en Inde, une nouvelle épidémie du virus NiV a provoqué la mort de 45 personnes (Harit *et al.*, 2006). Deux mois plus tard, les porcheries de Meherpur au Bangladesh ont signalé une autre épidémie touchant 12 personnes dont 6 sont décédées en six jours. Il s'agissait principalement des éleveurs de porcs ainsi que leurs familles (Hsu *et al.*, 2004). En janvier 2003, 17 personnes ont présenté les symptômes caractéristiques d'une infection par le virus NiV dans la région de Naogaon au Bangladesh (Hsu *et al.*, 2004). En 2004, deux épidémies qui ont touché un nombre de personnes plus important ont éclaté et ont entraîné un taux de mortalité atteignant les 75 % (WHO, 2004). De plus, il est possible que des cas d'infection n'aient pas été recensés. Chaque année, ce virus se manifeste pendant la période hivernale du mois de janvier au mois de mai, mais les épidémies qu'il entraîne restent pour l'instant localisées au Bangladesh et en Inde (Figure 21B et Tableau 4) (Luby *et al.*, 2009) (INVS).

A



B

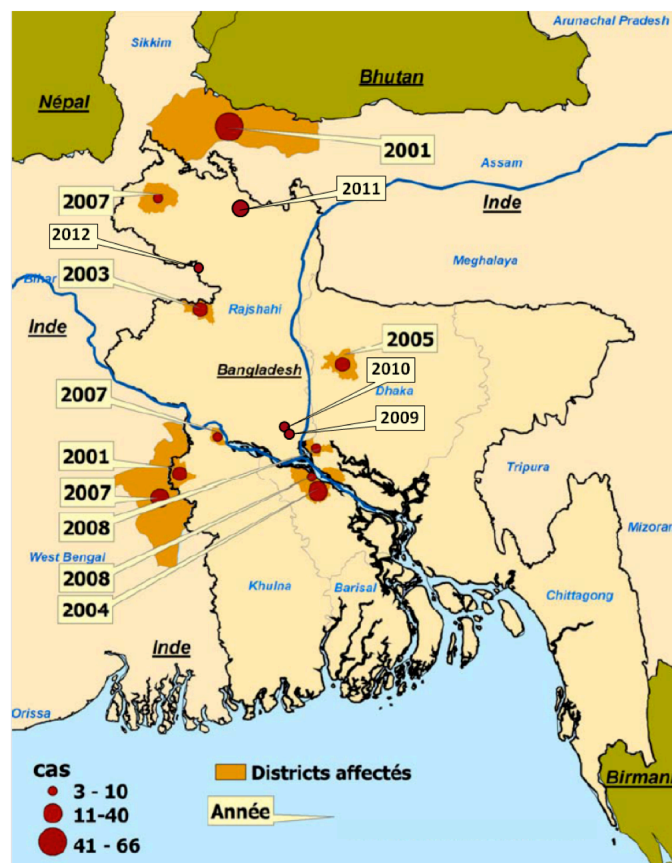


Figure 21. Épidémies des virus HeV et NiV

A. Epidémies du virus HeV en Australie. B. Epidémies du virus Nipah en Asie.

Pays	Région	Période	Cas	Décès	Létalité
Malaisie	Péninsule	Septembre 1998 - Avril 1999	265	105	40 %
Singapour	Singapour	Mars 1999	11	1	9 %
Inde	Siliguri	Février 2001	66	45	68 %
Inde	Nadia	Avril 2007	30	5	17 %
Bangladesh	Meherpur	Avril - Mai 2001	12	10	83 %
Bangladesh	Naogaon	Janvier 2003	17	8	47 %
Bangladesh	Goalando	Janvier - Février 2004	29	22	76 %
Bangladesh	Faridpur	Février - Avril 2004	36	27	75 %
Bangladesh	Tangail	Janvier - Mars 2005	12	11	92 %
Bangladesh	Thakurgaon	Janvier - Février 2007	7	3	43 %
Bangladesh	Kushtia	Mars - Avril 2007	8	5	63 %
Bangladesh	Dhaka	Février 2008	11	6	55 %
Bangladesh	Faridpur	Decembre 2009 - Mars 2010	17	15	88 %
Bangladesh	Rangpur	Février 2011	44	40	91 %
Bangladesh	Joypurhat	Janvier 2012	12	10	83 %
Sous-Total					
Inde / Bangladesh			280	211	75 %
Total			556	317	57 %

Tableau 4. Épidémies du virus NiV de 1998 à 2012

À partir du Bulletin Hebdomadaire International de l'Institut de Veille Sanitaire (INSV) N°83, 129, 227, 281 et (Marsh and Wang, 2012). nc : non communiqué.

4.3.2 Épidémiologie

Au cours des épidémies impliquant les virus NiV et HeV, plusieurs facteurs ont été observés.

4.3.2.1 Transmission du virus HeV

Dans 5 des 33 épidémies de virus HeV ayant induit la mort de 66 chevaux, 7 cas humains ont été répertoriés dont 4 n'ont pas survécu à l'infection (Playford *et al.*, 2010; Selvey *et al.*, 1995). En 2011, 18 épidémies localisées ont été recensées et ont provoqué la mort de 21 chevaux (Marsh and Wang, 2012). La contamination de la nourriture de ces derniers par les chauves-souris et/ou le contact direct avec les excréments de ces animaux, ont été proposés comme hypothèses pouvant expliquer la transmission du virus de la chauve-souris aux chevaux. Une seconde hypothèse était que la transmission cheval-homme, plus rare, était due à un contact direct entre l'homme et les fluides corporels des chevaux infectés (Williamson *et al.*, 1998). En revanche, à ce jour, il n'existe aucune évidence scientifique d'une transmission possible du virus de l'homme à l'homme, de l'homme aux chevaux, ou encore des chauves-souris à l'homme. Des études sérologiques menées sur

différentes espèces animales vivant dans les régions épidémiques impliquant le virus HeV, n'ont montré aucun signe d'infection, sauf pour les chauves-souris du genre *Pteropus* qui sont connues pour être les hôtes naturels de ce virus. En revanche, une expérience menée en laboratoire a montré que le virus HeV pouvait infecter les chevaux par voie orale, et que le virus se retrouvait ensuite dans les excréments ainsi que la salive. De plus, aucune contamination directe n'a pu être mise en évidence entre la chauve-souris et le cheval, et entre les chevaux.

4.3.2.2 L'épidémie Malaisienne du virus NiV

Compte tenu de l'identité génétique entre les virus HeV et NiV, les scientifiques ont supposé que le virus NiV avait probablement été transmis des chauves-souris à l'homme par un autre vecteur (Murray *et al.*, 1995b). Il s'est avéré que les personnes qui travaillaient dans les abattoirs porcins, avaient probablement été infectées en manipulant des cadavres de porcs contaminés. Le plus souvent, l'infection de ces animaux par le virus NiV est asymptomatique, ce qui rend difficile le dépistage d'une infection virale (Mohd Nor, Gan, and Ong, 2000). Les analyses réalisées sur les porcs contaminés ont montré la présence du virus NiV dans les sécrétions respiratoires et l'urine de ces animaux avec des séquences nucléotidiques identiques à celle trouvées chez les patients. Ce mode de contamination était donc vraisemblablement à l'origine de la transmission porc-homme (Centers for Disease Control and Prevention, 1999a; Parashar *et al.*, 2000).

Cependant, dans certains cas, les patients infectés n'avaient eu aucun contact avec les porcs, ce qui a suggéré l'existence d'un autre vecteur pour ce virus. Par la suite, le CDC a en effet montré que le virus NiV pouvait infecter les chats et les chiens (Figure 22) (Centers for Disease Control and Prevention, 1999b). Des anticorps anti-NiV ont été détectés chez 42 % des chiens domestiques vivant à proximité des porcheries suggérant que ces animaux pouvaient dans certains cas transmettre le virus à l'homme (Yob *et al.*, 2001). En revanche, aucun cas de transmission interhumaine n'a été observé (Mounts *et al.*, 2001).

En Malaisie, les chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* telles que *P.vampyrus* et *P.hypomelanus* se nourrissent de fruits qu'elles trouvent, soient dans les arbres fruitiers sauvages, soit dans les vergers plantés par les hommes souvent situés près des élevages de porcs. Il est donc probable que des porcs se soient retrouvés en contact avec des excréments de chauves-souris contaminées ou que tout simplement, des porcs aient mangé des fruits contaminés par de la salive de chauves-souris infectées (Chua *et al.*, 2002). En revanche, une contamination directe de la chauve-souris à l'homme n'a pas été envisagée.

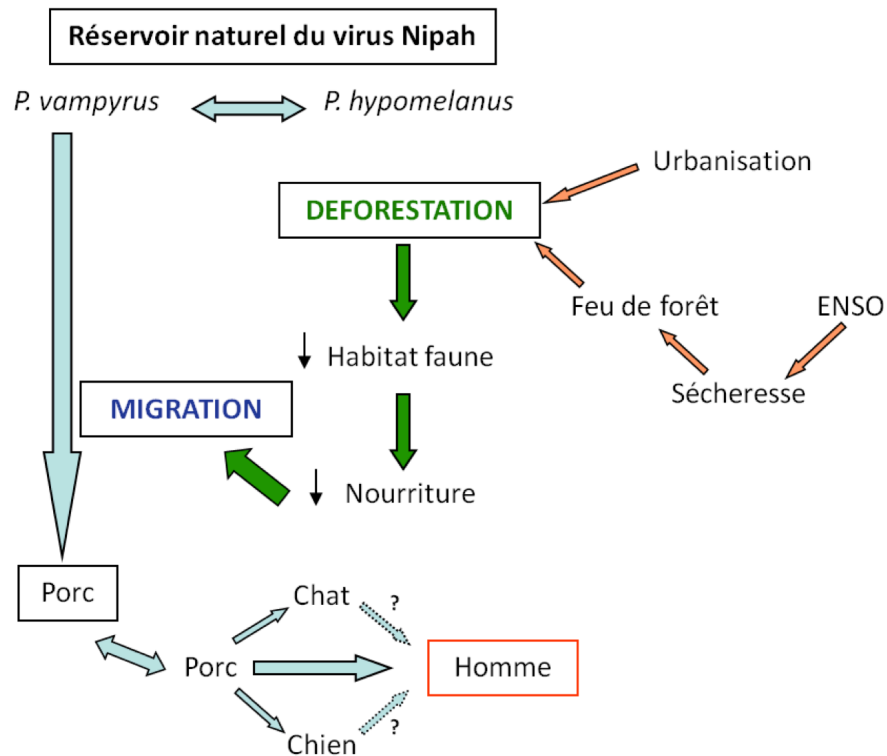


Figure 22. Représentation de l'émergence et de l'épidémiologie du virus NiV en Malaisie
Modifié d'après (Chua, 2003).

4.3.2.3 Les épidémies au Bangladesh et en Inde du NiV

Dans le cas des nombreuses épidémies ayant eu lieu au Bangladesh et en Inde, le mode de transmission du virus NiV a été un peu différent de celui observé en Malaisie. Les élevages de porcs ne sont pas très nombreux dans ces régions et une seule espèce de chauves-souris frugivores du genre *Pteropus* (*P.giganteus*) niche au Bangladesh. Des anticorps anti-NiV ont d'ailleurs été retrouvés dans le sang de ces dernières. Comparativement à la Malaisie où le porc a été reconnu comme étant le vecteur de transmission du virus de la chauve-souris à l'homme, il ne semble pas y avoir de vecteur animal mis en cause dans ces régions (Gurley *et al.*, 2007; ICDDR.B, 2004). Le virus NiV semble avoir été transmis directement de la chauve-souris *P.giganteus* à l'homme par d'autres moyens. En effet, les habitants du Bangladesh sont très friands d'une boisson à base d'huile de palme. Il s'avère que lors de la récolte de cette huile qui se déroule de préférence la nuit, les chauves-souris viennent se nourrir dans les pots de ces récoltes et contaminent l'huile. Une autre cause possible de contamination peut être un contact direct avec de l'urine ou de la salive de chauves-souris (Luby *et al.*, 2009). De plus, il semble que lors de ces épidémies, la transmission homme-homme soit très courante. En effet, au cours de l'épidémie de 2004, 33 personnes infectées sur 36 cas recensés (soit 92 %) ont eu un contact direct avec une ou plusieurs personnes infectées (ICDDR.B, 2004). Notamment, les

personnels de santé et les familles des personnes infectées et hospitalisées ont été à leur tour victime de l'infection par le virus NiV (Harit *et al.*, 2006). Le virus aurait donc pu se transmettre parmi les hommes par les aérosols provenant des personnes malades. De plus, sachant que plusieurs souches de virus NiV ont été recensées, il se pourrait qu'une de ces souches soit plus facilement transmissible d'homme à homme (Luby *et al.*, 2009).

4.3.3 Symptômes

4.3.3.1 Chez les hommes

Le virus HeV provoque, chez les personnes contaminées, des symptômes similaires à ceux observés lors d'un état grippal tels que des douleurs musculaires (myalgies), de la fièvre, des maux de têtes et des vertiges. Ces symptômes peuvent évoluer vers des pathologies plus graves telles que le développement d'une pneumonie, et/ou d'une encéphalite conduisant dans la plupart des cas à la mort de l'individu infecté. La période d'incubation définie comme étant la durée qui sépare le dernier contact avec un individu contaminé et les premiers symptômes de la maladie, est estimée entre 5 et 21 jours. La mort survient dans 50 % des cas (Hess *et al.*, 2011; Playford *et al.*, 2010). De plus, il semble qu'après le développement de symptômes légers, le virus puisse rester sous forme latente dans l'organisme de la personne infectée, se réactiver plusieurs mois plus tard et entraîner la mort de l'individu (Murray *et al.*, 1995a; O'Sullivan *et al.*, 1997). Compte tenu du faible nombre de cas d'infection du virus HeV recensé chez l'homme, peu d'informations sont disponibles pour décrire les symptômes observés.

Dans le cas du virus NiV, pendant les épidémies observées en Malaisie, les personnes infectées avaient entre 4 et 75 ans avec une moyenne d'âge de 38 ans et les hommes ont été majoritairement touchés (Chong *et al.*, 2000). Tous les patients étudiés ont vécu à proximité d'un élevage porcin ou travaillaient aux abattoirs porcins. Afin de caractériser les symptômes provoqués par le virus NiV, de nombreuses études cliniques ont été réalisées. Ces dernières ont montré que ce virus induisait une maladie qui affecte principalement le système nerveux central, entraînant dans quelques cas des problèmes pulmonaires. Parmi les personnes infectées, 8 à 15 % ont développé une infection asymptomatique (Figure 23) (Tan, Tan, and Goh, 1999).

La période d'incubation est d'environ 10 jours avec des variations allant de 1 à 32 jours suivant les patients et le temps d'exposition (Chong *et al.*, 2000). La mort est survenue environ 10 jours après l'apparition des premiers symptômes classiques d'une infection virale : fièvre, maux de tête, frissons, tremblements et myalgies. Certains patients ont signalé des symptômes grippaux, ou encore des problèmes intestinaux comme des

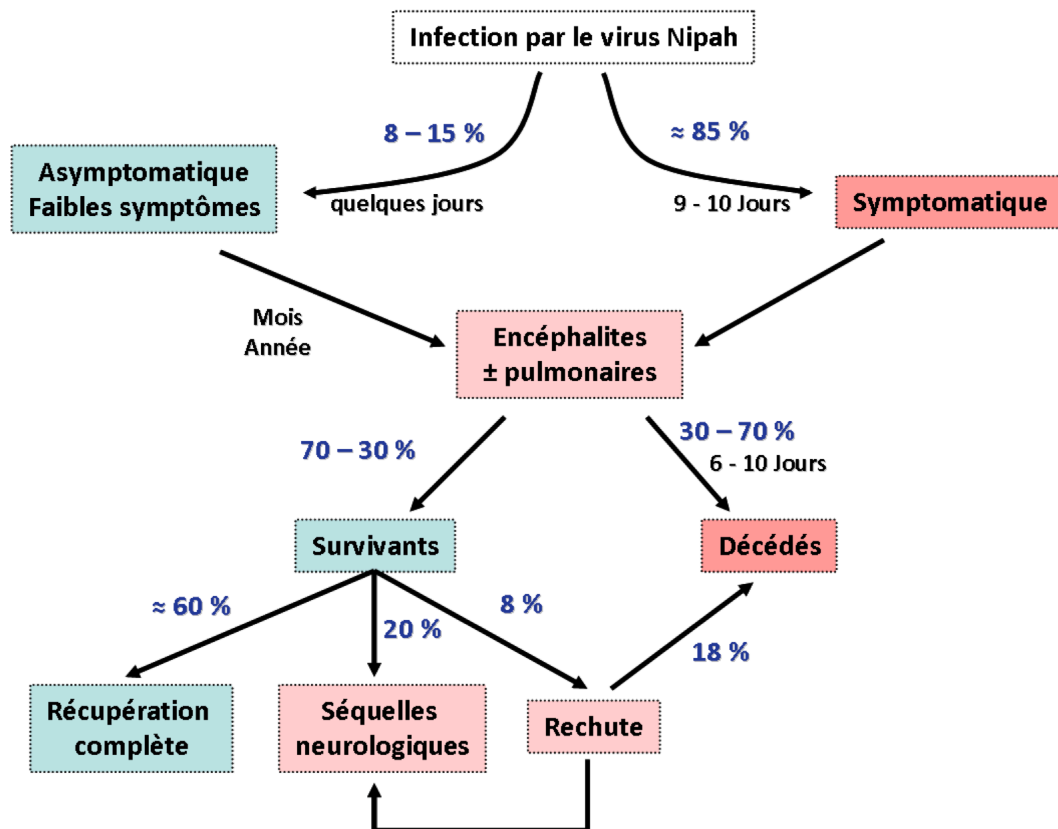


Figure 23. Évolution d'une infection humaine par le virus Nipah

Inspiré de (Horvat B., 2007).

diarrhées, des nausées, des vomissements et des douleurs abdominales. Ensuite, une aggravation des symptômes a été constatée comme l'établissement d'un état de somnolence, de confusion et de troubles neurologiques ciblés. Des symptômes plus graves ont été observés comme un coma, une tachycardie, de l'hypertension ainsi que des spasmes musculaires. Finalement, les personnes sont décédées à la suite d'une inflammation des méninges ou de multiples accidents vasculaires cérébraux (AVC) (Chong *et al.*, 2000; Chua *et al.*, 1999). La présence du virus NiV dans le fluide cébrospinal des patients a été associée à une forte mortalité malgré la présence d'anticorps IgM ciblant le virus NiV chez ces mêmes patients (Chua *et al.*, 2000b; Ramasundrum *et al.*, 1999). Le cerveau est majoritairement touché mais les poumons, le cœur et les reins sont également atteints (Chua *et al.*, 1999). Parmi les survivants de l'infection, 20 % ont conservé des séquelles neurologiques modérées et 8 % ont développé de nouveaux problèmes neurologiques plus sévères jusqu'à 4 ans après l'infection. Parmi les rechutes, 18 % se sont avérées mortelles (Figure 23) (Chong *et al.*, 2000; Goh *et al.*, 2000; Tan *et al.*, 2002). Le virus NiV a été isolé à partir de prélèvements buccaux, bronchiques et urinaires issus de patients infectés (Chua *et al.*, 2001).

Au cours des épidémies du Bangladesh et de l'Inde, les personnes touchées, majoritairement des hommes, avaient entre 2 et 50 ans avec une moyenne d'âge de 12 et 36

ans selon les épidémies (Hossain *et al.*, 2008). Les symptômes observés ont été relativement identiques à ceux observés pour les épidémies de Malaisie, mais avec une proportion de problèmes respiratoires bien plus importante (60 % des personnes infectées) (Marsh and Wang, 2012). Le temps d'incubation a été de 9 jours en moyenne, et la mort est survenue environ 6 jours après l'apparition des premiers symptômes. Un taux de mortalité bien plus important a été observé pour ces épidémies (Tableau 4) (Hossain *et al.*, 2008).

4.3.3.2 Chez les animaux

Des études sérologiques ont été réalisées sur plusieurs espèces d'animaux sauvages et domestiques vivant près des foyers des épidémies des virus HeV et NiV.

Chez les chevaux, le virus HeV provoque une anorexie, une dépression, un état fébrile ainsi que des difficultés respiratoires (Murray *et al.*, 1995a). La mort de ces animaux est plutôt due à des problèmes neurologiques tels que des encéphalites plutôt qu'à des problèmes respiratoires (Playford *et al.*, 2010). En revanche, aucun autre animal vivant sur les sites des épidémies n'a montré de signes d'infections et aucun anticorps anti-HeV n'a été détecté. Par contre, il est possible d'infecter expérimentalement des cochons d'Inde ou des chats par le virus HeV et ces derniers développent les symptômes de la maladie (Williamson *et al.*, 1998).

Les chiens, les chats, les chèvres, les porcs, les chevaux et les chauves-souris ont été infectés par le virus NiV mais, en revanche, certains rongeurs, les poulets, les oiseaux et les canards n'ont pas été infectés par ce virus (Chua, 2003). Les chats naturellement infectés par le virus NiV, montrent des problèmes vasculaires et respiratoires mais aucun signe d'encéphalite. Pour les porcs, la période d'incubation a été de 7 à 14 jours avec un taux de morbidité important (l'infection a touché 100 % des animaux) et un taux de mortalité de 5 à 15 %. L'infection des porcs a été le plus souvent asymptomatique et a provoqué, dans quelques cas, un état fébrile et des problèmes respiratoires et neurologiques (Mohd Nor, Gan, and Ong, 2000). Il n'y a pas de signe sérologique d'une infection naturelle des rongeurs par le virus Nipah en Malaisie (Bossart, Bingham, and Middleton, 2007). Chez les autres espèces infectées naturellement, aucun symptôme n'a été observé.

4.4 CARACTÉRISTIQUES DES HÉNIPAVIRUS

Après isolement du virus HeV en 1994 et séquençage partiel de son gène de matrice (M), ce virus a été associé au genre des *Morbillivirus* appartenant à la sous-famille des *Paramyxovirinae* de l'ordre des *Mononegavirales*. Cependant, après séquençage complet de

son génome, plusieurs différences notables ont renforcé le caractère unique de ce virus, suggérant qu'il ne pouvait être classé dans un des trois genres de Paramyxovirus existant à ce jour, à savoir les *Morbillivirus*, les *Respirovirus* et les *Rubulavirus*. Avec l'apparition du virus NiV, dont la structure, la séquence et les protéines possèdent un haut niveau de similarité avec ceux du virus HeV, un nouveau genre de Paramyxovirus a été créé en 2002 pour regrouper ces deux virus génétiquement proches, mais différents de tous les autres Paramyxovirus. C'est ainsi que les virus HeV et NiV ont été regroupés dans le nouveau genre des *Henipavirus*.

4.4.1 Structure génomique

Les Hénipavirus sont des virus enveloppés à ARN. En microscopie électronique, ils n'ont pas de formes définies (aussi appelés pléomorphiques) et peuvent passer d'une forme sphérique à une forme filamenteuse. Leur diamètre est très variable puisqu'il est compris entre 40 nm et 600 nm. Les caractéristiques ultrastructurales de ces virus sont légèrement différentes. En effet, des « projections » sont présentes à la surface de l'enveloppe virale, et possèdent deux tailles différentes pour le virus HeV, lui donnant un aspect de double franges ou « *double-fringed* » (Figure 24A). Le virus NiV, quand à lui, possède des projections d'une seule taille ou « *single-fringed* ». La nucléocapside recouvrant l'ARN a une structure tubulaire caractéristique des Paramyxovirus (Figure 24A et B) (Hyatt *et al.*, 2001).

Au sein de la particule virale, le génome ARN sb du virus est associé à un complexe contenant la nucléoprotéine (N) ainsi que la protéine « large » (L) et la phosphoprotéine (P). Ce complexe est entouré par la protéine de la matrice virale (M), associée à la face interne de l'enveloppe virale. Cette dernière est composée d'une bicouche lipidique et des deux glycoprotéines d'enveloppe, la protéine d'attachement (G) et la protéine de fusion (F) (Figure 24C).

Leur génome à ARN de polarité négative possède une taille qui est 15 % supérieure à celle des génomes des autres Paramyxovirus. La taille du génome du virus HeV est de 18 234 acides nucléiques (a.n) et celle du virus NiV varie suivant les souches de 18 246 à 18 252 a.n. Cette taille supérieure s'explique par la présence de régions non codantes dans les régions 3' des 5 premiers gènes (Figure 24D). Le génome code pour 6 protéines structurales principales à savoir ; les deux glycoprotéines d'enveloppe G et F ; les 3 protéines N, P et L, localisées au sein de la nucléocapside virale ; et la protéine de matrice M (Wang *et al.*, 2001). Il est à noter que la transcription du gène *P* conduit à la production de 4 protéines différentes ; la protéine P ; une protéine accessoire (C) produite à partir d'un deuxième cadre de lecture du gène *P* ; et les protéines V et W, dont la partie N-term est identique à la protéine P alors que la partie C-term diffère. Ces deux dernières protéines sont traduites à partir d'ARNm transcrits à

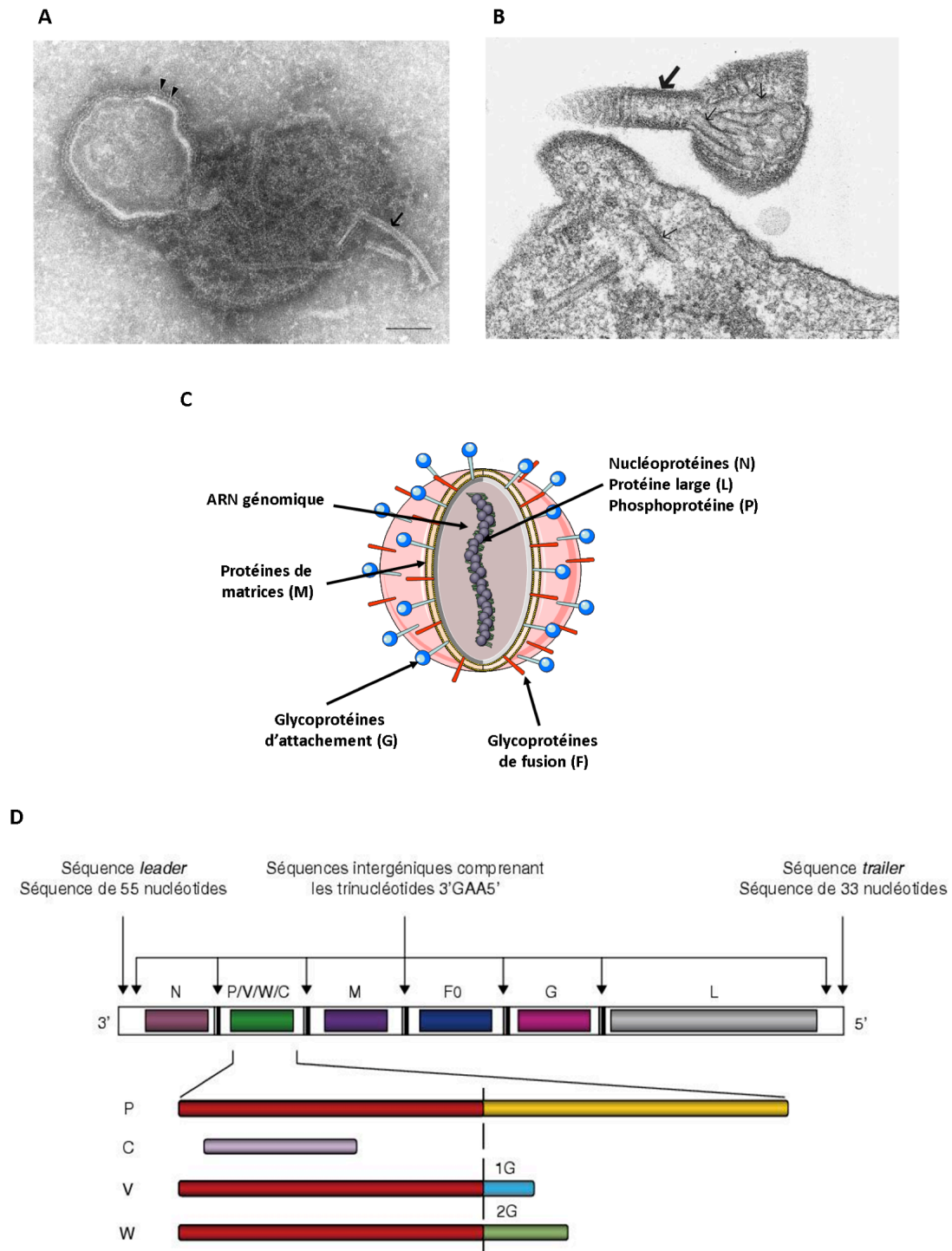


Figure 24. Structure des virus HeV et NiV

A. Visualisation du virus HeV et des nucléocapsides par microscopie électronique. L'extérieur de l'enveloppe du virus HeV possède en général deux types de projections, indiquées par les 2 triangles noirs. Les nucléocapsides, ressemblant à des structures tubulaires, sont localisées par la flèche noire.

B. Visualisation par microscopie électronique du virus NiV. Plusieurs formes du virus sont visibles, un virion en cours de maturation est désigné par la flèche noire et est associé à des capsides de formes tubulaires présentées par les petites flèches noires.

C. Représentation schématique des Hénipavirus.

D. Génome d'ARN des Hénipavirus. Pour **A** et **B**, la barre noire en bas à droite représente une longueur de 100 nm. D'après (Hyatt *et al.*, 2001) et (Horvat *et al.*, 2007).

partir du gène *P* mais ayant subi l'insertion d'un ou deux nucléotides G conduisant à un changement de cadre de lecture.

4.4.2 Hétérogénéité génétique

Le séquençage de souches du virus HeV isolées de prélèvements équins ou humains a permis de mettre en évidence que les souches virales infectant ces organismes sont identiques, et très proches des isolats du virus HeV détectés dans les chauves-souris (Halpin *et al.*, 2000; Murray *et al.*, 1995b).

Concernant le virus NiV, plusieurs souches sont aujourd'hui décrites. En ce qui concerne l'épidémie malaisienne, il semble que deux souches de NiV se soient introduites dans la population porcine mais seule une souche s'est propagée chez l'homme et a provoqué les épidémies (Figure 25). Ces souches de virus NiV sont identiques génétiquement et correspondent à la souche de virus NiV retrouvée dans les chauves-souris vivant dans la région. De plus, la séquence nucléotidique du virus NiV isolé de patients infectés est très similaire à la séquence retrouvée chez les chauves-souris, suggérant que la dissémination du virus s'est produite récemment (Chua *et al.*, 2002).

En revanche pour les épidémies du Bangladesh, plusieurs souches possédant une hétérogénéité de séquence ont été impliquées (Figure 25). Ceci est probablement dû à l'introduction du virus dans différentes colonies de chauves-souris (Harcourt *et al.*, 2005). Entre les souches de Malaisie et du Bangladesh, la taille du génome varie de 6 nucléotides, l'identité de séquence en acide nucléique est de 91.8 % et concernant les acides aminés plus de 92 % de correspondance a été observée (Harcourt *et al.*, 2005). Pour les protéines F et G, quelques modifications sont à noter, dont la plupart ont lieu dans les parties non traduites. Plus précisément, le domaine transmembranaire et les 17 résidus cystéines de la protéine G sont conservés entre les 2 souches, et 6 sites de N-glycosylation sur 8 sont conservés pour la souche du Bangladesh (Harcourt *et al.*, 2005). Le virus NiV a été également isolé à partir de prélèvements réalisés sur des chauves-souris localisées au Cambodge et ce virus présente un lignage différent de ceux observés pour la Malaisie ou le Bangladesh (Reynes *et al.*, 2005).

Il est important de noter que le laboratoire P4 Jean Mérieux de Lyon n'a à sa disposition qu'une seule souche de virus NiV. Il s'agit de la souche malaisienne UMMC1 (*University Malaya Medical Center*, numéro d'accès AY029767) qui a été isolée à partir d'un prélèvement de fluide cérébrospinal en 1999 (Chan *et al.*, 2001). Concernant la souche de virus HeV mise à disposition par le laboratoire P4, l'isolat provient du laboratoire Porton Down en Angleterre. Ces deux souches d'Hénipavirus ont été utilisées pour effectuer ce travail de thèse.

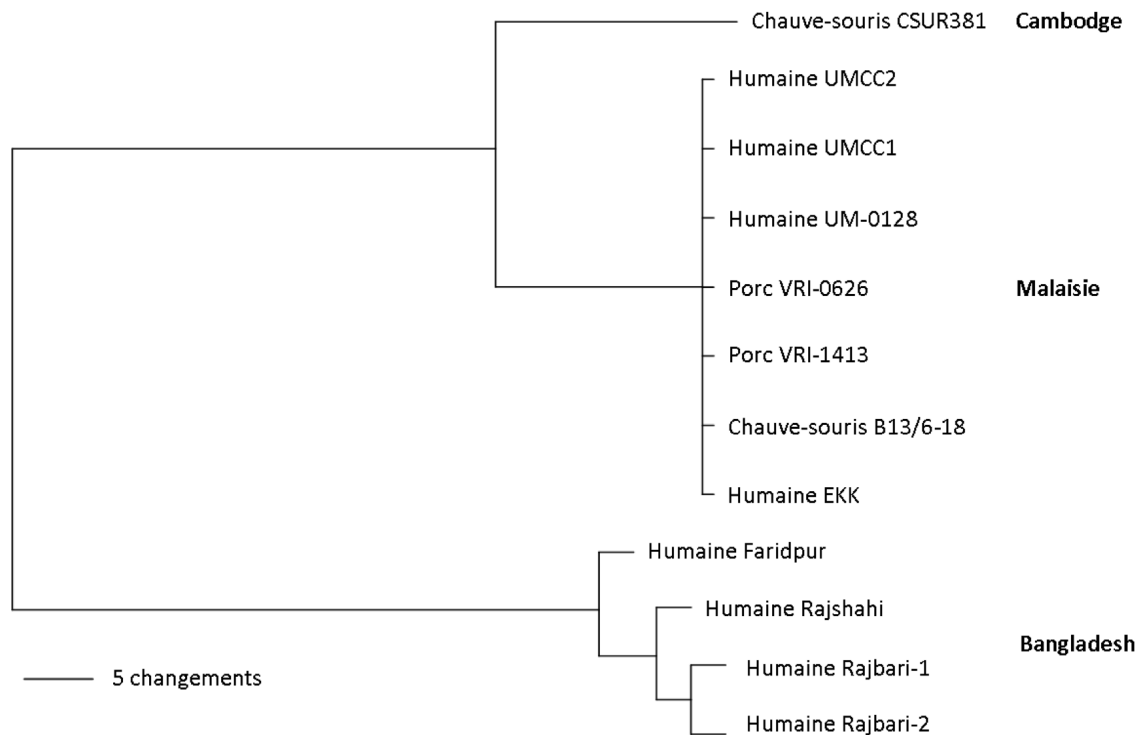


Figure 25. Relations phylogénétiques entre des séquences génétiques du gène *N* de différentes souches du virus Nipah

Ces séquences proviennent de prélèvements de chauves-souris, de porcs et d'humains de trois pays différents : le Cambodge, la Malaisie et le Bangladesh. Adapté de (Eaton, Mackenzie, and Wang, 2007). La barre d'échelle représente 5 changements sur la totalité de la séquence d'a.n du gène *N* du virus NiV. Cet arbre a été établi avec la méthode du maximum de parcimonie.

4.4.3 Cycle réplcatif *in vitro* et *in vivo*

Après adsorption du virus à la membrane de la cellule hôte via la protéine G, l'enveloppe virale fusionne avec la membrane cellulaire via la protéine F par un mécanisme indépendamment du pH. Une étude récente a également montré que le virus NiV peut entrer dans les cellules par macropinocytose, au niveau des lamellipodes et des filopodes (Pernet *et al.*, 2009). Les nucléoprotéines sont ensuite libérées dans le cytoplasme et le cycle réplcatif du virus commence avec la transcription par la polymérase L associée à la protéine P, du génome ARN négatif en multiples ARNm. La quantité d'ARNm produite dépend de la distance entre le gène et le promoteur viral unique situé en position 3' du génome, permettant l'établissement d'un gradient décroissant des ARNm N à L. Les ARNm sont traduits en protéines pendant que le génome ARN négatif sert de support à la formation d'un ARN viral complémentaire positif utilisé comme matrice pour la réplcation du génome viral. Les ARNm F et G sont traduits par les ribosomes associés au réticulum endoplasmique puis les protéines sont transportées à la membrane plasmique par la voie sécrétrice. Tous les autres ARNm viraux sont traduits par les ribosomes libres dans le cytoplasme. Les protéines

virales issues du gène *P* inhibent la réponse IFN dans les cellules infectées (Eaton *et al.*, 2006a). Une fois que la protéine N est produite en quantité suffisante, la polymérase L passe de la transcription à la réplication du génome viral. Les ARN génomiques négatifs néo-synthétisés sont immédiatement encapsidés par la protéine N pour former les complexes ARN-nucléoprotéiques. L'assemblage final a lieu au niveau de la membrane plasmique puis les particules sont libérées dans le milieu extracellulaire par bourgeonnement (Lambert and Parks, 2007).

In vitro, les virus HeV et NiV infectent une large variété de cellules testées en laboratoire et provoquent la formation de cellules géantes multinuclées ou syncytia. De plus, au laboratoire P4, les cellules Vero sont utilisées pour leur production *in vitro* (Chua *et al.*, 2000a; Chua *et al.*, 1999).

Après infection d'un organisme, le premier site de réplication du virus reste encore inconnu. En revanche, le second site de réplication semble être localisé au niveau des cellules du système vasculaire. En effet, le virus se dissémine rapidement dans l'organisme, touchant de nombreux organes (cerveau, poumons, cœur, rein) et induisant l'inflammation des vaisseaux sanguins. Ainsi des thromboses et des ischémies apparaissent, pouvant être visualisés par une analyse immunohistochimique des organes touchés. Les cellules infectées par les virus HeV et NiV sont les cellules endothéliales des artères, les fibres musculaires lisses, les neurones et quelques types de cellules épithéliales (Chua *et al.*, 2000a ; Chua *et al.*, 1999 ; Eaton, Mackenzie, and Wang, 2007; Wong *et al.*, 2002).

4.4.4 Protéines virales et récepteurs cellulaires

4.4.4.1 La protéine F

La protéine F est une protéine transmembranaire de fusion de classe I de 546 a.a d'un poids de 60 kDa et possédant deux hélices alpha. Cette protéine possède deux formes, une forme inactive caractérisée par une protéine précurseur nommée F_0 et une forme active où le précurseur est clivé en deux sous unités F_1 et F_2 . Lors d'une infection de cellules par un Hénipavirus, la protéine précurseur F_0 est produite et glycosylée dans le réticulum endoplasmique puis s'oligomérisent en trimères. Le trimère est transporté à la membrane plasmique grâce à l'appareil de Golgi. Avant l'incorporation de la protéine dans les nouveaux virions, la protéine F_0 est clivée en deux sous-unités, F_1 et F_2 , reliées par des ponts disulfures. La Cathepsine L serait responsable du clivage protéolytique du précurseur F_0 (Eaton *et al.*, 2006a). Le site de clivage de la protéine F_0 pour le virus NiV est identifié par la séquence suivante, VGDVRLAG. Pour le virus HeV, l'arginine (R) est remplacée par une lysine (K). Le produit de clivage F_1 contient plusieurs domaines, à savoir, le peptide de fusion permettant

l'initiation du processus de fusion situé à l'extrémité N-term, le domaine transmembranaire pour l'ancrage de la protéine dans la membrane lipidique et un motif tyrosine qui permet l'endocytose de la protéine F. Pour les Hénipavirus, la séquence en a.a du peptide de fusion commence par une leucine alors que pour les autres paramyxovirus, il commence par une phénylalanine. De plus, cette protéine possède de nombreux sites de N-Glycosylation, trois au niveau de la sous-unité F₂ et deux dans la sous-unité F₁ (Diederich and Maisner, 2007). À la surface de l'enveloppe virale, les glycoprotéines F et G sont associées de façon non covalente. Lorsque le virus s'attache au récepteur cellulaire par sa protéine G, la protéine F est libérée et induit le rapprochement des membranes virales et cellulaires puis la fusion de ces deux membranes (Figure 26). Cette étape conduit à la libération du complexe de la nucléocapside (ARN + N + P + L) au sein du cytoplasme. Afin de réaliser ce processus de

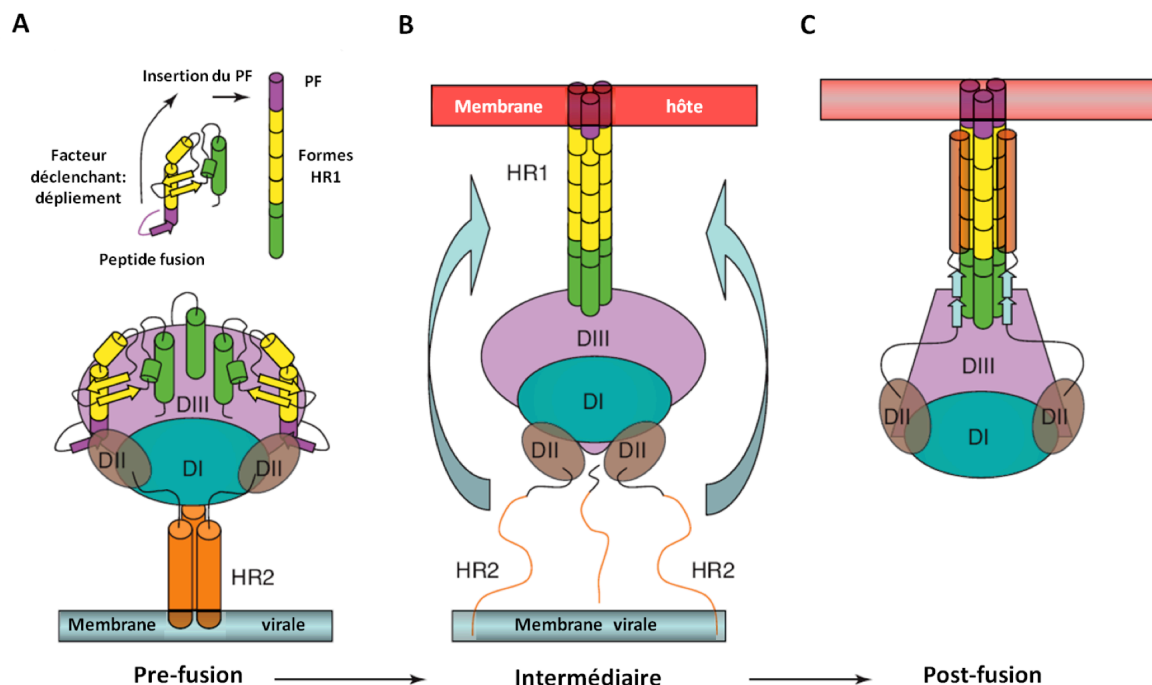


Figure 26. Représentation schématique du processus de fusion engendré par la protéine F

A. Etat de la protéine F avant la fusion. La glycoprotéine F du virus Nipah est représentée à la surface de la membrane virale sous la forme clivée F₁, la sous-unité F₂ n'est pas représentée ici. La partie extracellulaire de la protéine F₁ est composée des domaines I, II et III ainsi que des deux régions structurées HR1 et HR2. Le peptide de fusion (PF) est représenté en violet et est masqué par le repliement de la région HR1. Sous l'effet d'un facteur déclencheur, les domaines HR1 vont se déplier et libérer le peptide fusion. **B.** Protéine F pendant le processus de fusion. Le peptide fusion va s'insérer dans la membrane de la cellule hôte, permettant à la protéine F dépliée de faire le lien entre les deux membranes. Les domaines HR2 se déplient, offrant une liberté de mouvement à la protéine F. **C.** Etat de la protéine F au moment de la fusion. Les domaines HR2 se positionnent à 180° de leur position d'origine permettant d'amener la membrane virale en contact avec la membrane de la cellule hôte, favorisant la fusion membranaire. Source (Lee and Ataman, 2011).

fusion, la protéine F possède, d'une part, un peptide de fusion situé à l'extrémité N-term de la sous-unité F1 et d'autre part, deux régions structurées en hélice α amphipathiques composées de répétitions de 7 a.a. Ces domaines sont nommés HR1 et HR2 (*Heptad Repeats*) et permettent le rapprochement des membranes virales et cellulaires (Figure 26).

4.4.4.2 La protéine G

Les protéines d'attachement cellulaires de la plupart des Paramyxovirus possèdent des activités neuraminidase et hémagglutinine. En revanche, la protéine d'attachement des Hénipavirus ne possède aucune de ces deux activités (Diederich and Maisner, 2007; Eaton *et al.*, 2006a). Cette protéine d'attachement G est une glycoprotéine membranaire de type II de 602 a.a pour 67 kDa possédant une queue cytoplasmique en N-term, une seule hélice transmembranaire, une courte région extracellulaire et une partie globulaire extracellulaire en C-term avec 6 brins d'hélice bêta (Eaton *et al.*, 2006a). L'analyse par WB de cette protéine dans un système cellulaire *in vitro* a montré une taille plus importante de la protéine G variant entre 72 et 75 kDa (Bossart *et al.*, 2001; Bossart *et al.*, 2002; Tamin *et al.*, 2002). En effet, cette protéine possède 8 sites de N-glycosylation, et après avoir subi les transformations post-traductionnelles, son poids est augmenté par l'ajout des sucres (Figure 27A) (Bowden *et al.*, 2008b). De plus, elle possède des caractéristiques structurales similaires à celles de Respirovirus (Horvat B., 2007). Elle est essentielle pour l'attachement du virus à la membrane cellulaire et est requise pour favoriser la fusion des membranes lipidiques (Bossart *et al.*, 2002). A la membrane cellulaire, cette protéine forme des tétramères liés par des ponts disulfures. Ainsi, trois formes de protéines G peuvent être retrouvées, la forme monomérique, la forme dimérique et la forme tétramérique (Figure 27B) (Bowden *et al.*, 2008a; Bowden *et al.*, 2008b; Harcourt *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1998).

4.4.4.3 Le récepteur cellulaire

La plupart des Paramyxovirus utilisent les acides sialiques comme récepteur cellulaire mais ce ne semble pas être le cas des Hénipavirus. En 2005, le récepteur cellulaire des virus NiV et HeV a été identifié. Pour celà, la partie extracellulaire de la protéine G (ectodomaine) a été fusionnée à la région Fc d'un anticorps IgG1 humain. Ainsi, par immunoprécipitation, une protéine membranaire de 48 kDa a été retrouvée fixée à l'ectodomaine de la protéine G (Bonaparte *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2005). Cette protéine a été identifiée comme étant la protéine EphrinB2. Il s'agit d'une glycoprotéine servant de ligand aux récepteurs Ephrin (Eph) qui sont des récepteurs à tyrosine kinase tels que les récepteurs EphA4 ou EphB2

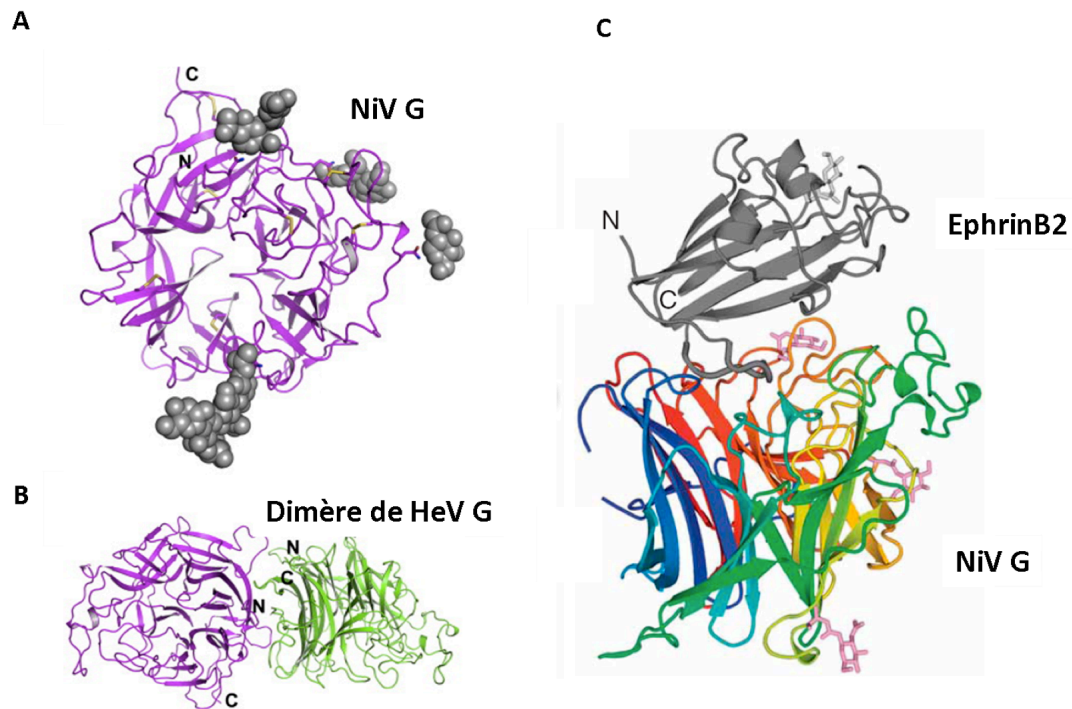


Figure 27. Structure de la protéine G et de son interaction avec le récepteur EphrinB2

A. Forme monomérique de la protéine G du virus NiV. Les ponts disulfures sont localisés en jaune et quelques résidus de glycosylations sont représentés par les sphères grises. **B.** Structure de la forme dimérique de la protéine G du virus HeV. **C.** Schéma représentant l'interaction entre la protéine G sous forme monomérique et le récepteur EphrinB2. La protéine G est représentée par des couleurs de l'arc-en-ciel, où le bleu positionne la partie N-term et le rouge la partie C-term de la protéine. L'EphrinB2 est représentée en gris. Des résidus de glycosylation sont également représentés par les bâtons roses pour la protéine G et gris pour le récepteur. Source (Bowden *et al.*, 2008a; Lee and Ataman, 2011).

(Eaton *et al.*, 2006a; Xu, Broder, and Nikolov, 2012). L'EphrinB2 est une protéine très importante dans le développement embryonnaire des vertébrés et joue notamment un rôle dans l'orientation axonales du système nerveux, dans le développement du système vasculaire et participe à la régulation de la communication entre cellules. L'EphrinB2 est une protéine exprimée dans les cellules neuronales, les cellules du muscle lisse (les parois du tube digestif, les artères, la vessie, les bronches), les cellules endothéliales artérielles et les capillaires. Ainsi cette protéine est très présente au niveau de l'épithélium bronchique. Les virus NiV et HeV utilisent ce récepteur pour entrer et fusionner avec la cellule hôte. Compte tenu de la présence de cette protéine dans les tissus mentionnés précédemment, le tropisme cellulaire des Hénipavirus s'explique d'autant mieux. De plus, la protéine EphrinB2 a une expression ubiquitaire, ce qui explique pourquoi de nombreuses espèces sont infectées par ces virus (Bowden *et al.*, 2008a; Eaton *et al.*, 2006a). Il est important de noter que même si le virus HeV n'a pas été détecté que chez les chevaux, cela ne signifie pas qu'il

n'a pas infecté d'autres organismes, dans lesquels il aurait été éliminé par le système immunitaire de l'hôte.

La protéine EphrinB2 est exprimée sous forme d'un dimère. Elle présente un domaine globulaire composé de huit brins arrangés en deux feuillets autour d'un core hydrophobe. Elle porte à sa surface deux domaines impliqués dans sa dimérisation et son interaction avec les récepteurs Eph (Toth *et al.*, 2001). Des études cristallographiques étudiant la liaison entre la glycoprotéine et son récepteur cellulaire ont montré que cette interaction était indépendante de l'acide sialique. De plus, cette interaction s'effectue par l'engagement d'une protéine G avec une protéine EphrinB2 (Figure 27C). La zone de contact est relativement plate. La seule différence entre les Hénipavirus lors de la liaison de la protéine G à son récepteur, est la présence sur la protéine G en position 507 d'une valine pour le virus NiV et d'une thréonine pour le virus HeV (Bowden *et al.*, 2008a; Xu, Broder, and Nikolov, 2012). Lors d'une infection par le virus NiV, l'expression de la protéine G à la surface des cellules permet non seulement la formation de syncytia mais entraîne également une régulation négative de la protéine EphrinB2 car la protéine G se fixe à ce récepteur et induit son internalisation (Pernet *et al.*, 2009).

D'autres membres de la famille des protéines Ephrin existent et ont été évalués pour leur capacité à se lier à la protéine G des Hénipavirus. L'EphrinB1 ne se lie à aucune protéine connue, en revanche, l'EphrinB3 semble être un récepteur pour le virus NiV. En effet, l'Ephrin B3 est exprimée dans certaines régions du cerveau où EphrinB2 n'est pas présente mais également au niveau des cellules épithéliales bronchiques et intestinales. Ce récepteur pourrait ainsi contribuer aux pathologies observées dans le système nerveux central après une infection par le virus NiV. En revanche, l'affinité de liaison de la protéine G du virus NiV est plus forte pour le récepteur EphrinB2 que pour le récepteur Ephrin B3 (Horvat B., 2007; Negrete *et al.*, 2006; Xu, Broder, and Nikolov, 2012).

4.4.5 Homologie entre les virus NiV et HeV

L'expression des protéines F et G à la surface des cellules, en présence du récepteur cellulaire, induit la formation de syncytia. Ces syncytia peuvent se développer en présence des protéines homologues (les protéines F et G du virus NiV) ou avec des protéines hétérologues. Par exemple, l'expression de la protéine F du virus NiV avec de la protéine G du virus HeV au sein d'une cellule, induit la formation de syncytia, probablement dû aux fortes identités de séquences existant entre les protéines F et G des Hénipavirus (Bossart *et al.*, 2002; Tamin *et al.*, 2002).

Les virus HeV et NiV étant classés dans le même genre de classe phylogénétique, il est important de connaître leur identité de séquence en a.n et en a.a (Tableau 5). De manière générale, en considérant les séquences en acides aminés, ces deux virus sont assez homologues avec plus de 80 % d'identité de séquence. La protéine N possède la plus forte identité de séquence en a.a entre les deux virus mais pas la plus forte en séquences nucléotidiques (Wang *et al.*, 2001).

De plus, les gènes *N* de Nipah et Hendra ne possèdent que 49 % d'identité avec les autres gènes *N* de la famille des Paramyxovirus (Chua *et al.*, 2000a; Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001). Le gène *F* du virus NiV possède 74 % d'identité de séquence avec le gène *F* du virus HeV, et ces deux virus possèdent 70 % d'identité pour le gène *G*. La protéine G du virus NiV est homologue à celle du virus HeV avec 83 % d'identité de séquence et 88.1 % entre les protéines F (Harcourt *et al.*, 2000; Wang *et al.*, 2001).

Gene	Virus	longueur en a.a	Cadre de lecture ouvert		Région 5' non traduite		Région 3' non traduite	
			% d'identité en a.a	% d'identité en a.n	longueur en a.n	% d'identité en a.n	longueur en a.n	% d'identité en a.n
N	HeV	532	92,1	78,4	57	66,7	568	41,1
	NiV	532			57		586	
P	HeV	707	67,6	70,5	105	41,9	469	40,9
	NiV	709			105		469	
V	HeV	54	81,1	88,5				
	NiV	51						
C	HeV	166	83,2	85				
	NiV	166						
M	HeV	352	89	77,1	100	40	200	40
	NiV	352			100		200	
F	HeV	546	88,1	74,2	272	44,1	418	41,4
	NiV	546			284		412	
G	HeV	604	83,3	70,8	233	43,8	516	45,6
	NiV	602			233		504	
L	HeV	2244	86,8	73	153	54	67	58,2
	NiV	2244			153		67	

Tableau 5. Comparaisons entre les séquences protéiques et génétiques des Hénipavirus

a.a : acide aminé, a.n : acide nucléique. Les pourcentages d'identité de la protéine et de la séquence du gène *G* entre les deux virus sont notifiés en bleu. Modifié de (Wang *et al.*, 2001).

4.5 LES MODÈLES ANIMAUX

En l'absence d'informations précises sur les pathologies et sur le mode de fonctionnement des Hénipavirus lors d'une infection chez l'homme, il est important de pouvoir étudier plus en détails les étapes de l'infection dans des modèles animaux reproduisant entièrement ou partiellement les symptômes observés chez les hommes. Ainsi,

de nombreux animaux de petite et grande taille pouvant être utilisés dans des laboratoires de recherches ont été évalués pour leur sensibilité aux infections par les Hénipavirus (Broder, 2012a; Williamson and Torres-Velez, 2010).

Les souris ne développent aucun symptôme après avoir été injectées par le virus NiV ou HeV par voie SC, IN ou IP, mais les Hénipavirus peuvent entraîner la mort des souris s'ils sont injectés par voie intracrânienne (Eaton, Broder, and Wang, 2005). De plus, des souris Swiss inoculées par le virus NiV par voie IN ou IP n'ont développé aucun signe clinique mais ont développé des anticorps dirigés contre le virus (Wong *et al.*, 2003).

Par contraste, le hamster doré est sensible à l'infection par les Hénipavirus et reproduit la pathologie et la pathogénèse observées chez l'homme, impliquant l'apparition des symptômes neurologiques et respiratoires décrits précédemment. Concernant le virus NiV, l'animal décède entre 9 et 29 jours après administration du virus par voie IN et entre 5 et 9 jours après injection par voie IP. La dose de virus inoculée joue également un rôle dans le délai d'apparition des symptômes qui apparaissent de façon dose-dépendante. La voie d'injection IP permet un développement plus rapide des symptômes ainsi que l'utilisation d'une quantité plus faible de virus par animal comparé à la voie d'injection IN. En revanche, la voie IN représente une voie d'administration plus naturelle. Dans ce cas, quelques symptômes sont observés comme un déséquilibre, une paralysie des membres, une léthargie, des spasmes musculaires ou encore des problèmes respiratoires conduisant à la mort des animaux (Wong *et al.*, 2003). Pour les animaux ayant survécu 30 jours après administration d'une faible dose de virus soit environ 10 pfu (*plaque forming unit*) par animal par voie IP, aucune séroconversion n'a été observée. De plus, malgré le fait que le virus se retrouve dans l'urine des animaux infectés, aucune contamination n'a pu être observée entre des animaux sains et des animaux infectés, vivant dans la même cage. Tous les organes sont touchés dont notamment les poumons, le cerveau, la rate et les reins, et plus particulièrement les vaisseaux sanguins composant ces organes. Des analyses histopathologiques ont montré la présence de syncytia ainsi que de multiples lésions et inflammations dans ces organes. Même si le lieu de la première réplication n'est pas connu, certains indices montrent que la rate serait un site actif de réplication du virus chez le hamster (Rockx *et al.*, 2011; Wong *et al.*, 2003). Concernant une infection par le virus HeV, une dose de 1000 pfu par animal induit la mort de l'animal en 5 jours. Les symptômes observés et les organes touchés sont identiques à ceux observés pour le virus NiV (Guillaume *et al.*, 2009; Rockx *et al.*, 2011).

Le cochon d'Inde est également un animal étudié. Une infection de cet animal par le virus HeV entraîne le développement d'une encéphalite importante mais l'animal ne développe que peu de problèmes respiratoires. Une injection de virus HeV par voie SC induit

le développement de la maladie 7 à 15 jours post-injection. Ce modèle animal est utilisé pour mieux comprendre le développement des encéphalites en général. Il est également utilisé pour étudier la transmission transplacentaire du virus HeV (Williamson and Torres-Velez, 2010). Des cochons d'Inde infectés par le virus NiV montrent des signes cliniques très variables suivant la voie d'injection utilisée et la dose. Par exemple, une injection de 10^7 pfu par animal de virus NiV par voie IP induit le développement d'une fièvre et une perte de poids chez les animaux infectés 5 à 7 jours après infection mais ces animaux récupèrent rapidement (Wong *et al.*, 2003). En revanche, l'injection par voie IP de 10^4 pfu par animal a induit la mort chez 26 animaux sur 28 (Torres-Velez *et al.*, 2008).

Les Hénipavirus peuvent également infecter le chat et induire des symptômes caractéristiques. Pour le virus HeV, ce modèle reproduit les symptômes observés chez les chevaux et les hommes. En effet, le virus HeV administré par voie SC, orale ou IN induit l'apparition de difficultés respiratoires ainsi que des problèmes de motricité 4 à 10 jours après l'infection. Le virus est détecté dans les poumons, la rate, le cerveau, les reins et l'urine. De plus, le virus se transmet d'un animal à l'autre lorsqu'ils sont hébergés dans la même cage (Williamson and Torres-Velez, 2010). Pour le virus NiV, des symptômes respiratoires plus sévères sont observés pour cet animal (Mungall *et al.*, 2006). L'administration du virus par injection ou par voie orale induit un état fébrile 6 à 8 jours après administration mais la mort de l'animal ne survient que rarement. Chez ces animaux, aucune encéphalite n'a pu être observée après infection par le virus HeV ou NiV (Bossart, Bingham, and Middleton, 2007; Eaton, Broder, and Wang, 2005; Williamson and Torres-Velez, 2010).

Le furet et le porc sont aussi des modèles animaux pour le virus NiV. Chez le furet, des similarités significatives en termes de physiologie et de morphologie ont pu être observées entre des poumons humains et des poumons de furets. Le furet est sensible à l'infection par le virus NiV qui entraîne l'apparition de symptômes respiratoires et neurologiques (Bossart, Bingham, and Middleton, 2007). Ce modèle est principalement utilisé pour mieux comprendre l'infection respiratoire. Les symptômes de la maladie sont déclenchés 6 à 10 jours après administration du virus par voie oronasale. De nombreux symptômes ont pu être observés comme de la fièvre, une perte d'appétit, une dépression, de la toux, des problèmes respiratoires et dans quelques cas des dysfonctionnement du système nerveux central. Le génome du virus NiV est détecté dans le sang, le cerveau, le foie, les testicules, les reins, les poumons, les ganglions et la rate (Bossart, Bingham, and Middleton, 2007). Les porcs ont également été utilisés comme modèle animal car ils ont été largement infectés lors de la première épidémie du virus NiV mais pour la plupart sans symptômes apparents. Dans certains cas, des signes cliniques comme des problèmes respiratoires ou des encéphalites se sont manifestés mais le taux de mortalité est resté

faible (Bossart, Bingham, and Middleton, 2007). Malheureusement, ces animaux sont trop imposants pour une utilisation en expérimentation animale au laboratoire P4.

En 2010, les singes ont également été utilisés comme modèle expérimental contre les virus HeV et NiV. En effet, il est très important de pouvoir tester l'efficacité de nouveaux traitements ou de vaccins sur un modèle aussi proche de l'homme que possible. Une injection de virus NiV par voie IV chez des singes *Saimiri* a entraîné un taux de mortalité élevé accompagné de signes cliniques neurologiques et respiratoires avec des preuves de réplication virale (Marianneau *et al.*, 2010). Également, une administration intratrachéale de virus HeV chez le singe vert africain a induit une perte d'activité, une dépression, puis l'infection a conduit à des symptômes respiratoires graves ainsi qu'à une perte de mobilité, entraînant la mort des animaux infectés (Rockx *et al.*, 2010). Des résultats similaires ont été observés chez ces animaux après une infection par le virus NiV (Geisbert *et al.*, 2010).

En conclusion, pour l'étude des Hénipavirus, virus classés comme agents pathogènes de classe 4, l'utilisation de petits modèles animaux reproduisant les symptômes caractéristiques de l'infection est essentielle. En effet, de par l'infrastructure de haute sécurité requise pour manipuler ces virus et la faible place disponible dans les animaleries des laboratoires P4, il est important de réaliser les premières expériences *in vivo* sur de petits animaux. Le modèle expérimental du hamster est très approprié pour une première étude *in vivo* car il permet une fois infecté de reproduire les symptômes humains de la maladie, laquelle est associée à une forte mortalité. Ce modèle convient parfaitement pour tester des traitements thérapeutiques ou vaccinaux. Le chat et le furet conviennent également mais nécessitent une infrastructure plus importante. Les singes quant à eux, constituent un modèle animal adéquat pour des essais précliniques afin de valider l'efficacité d'un traitement ou d'un vaccin avant de passer aux études cliniques chez l'homme.

4.6 TRAITEMENTS DISPONIBLES CONTRE LES HÉNIPAVIRUS

4.6.1 Molécules chimiques

Lors de la première épidémie du virus NiV en Malaisie, la ribavirine, une drogue antivirale, a été administrée à 65 % des 103 patients hospitalisés dans le centre médical à Seremban (Chong *et al.*, 2000). En effet, la ribavirine, molécule synthétisée en 1974, a été utilisée comme molécule antivirale à large spectre contre de nombreux virus à ADN et ARN. Son utilisation chez des patients infectés a été associée à une réduction de la mortalité de 36 % sans effet secondaire notable (Chong *et al.*, 2001b; Lam, 2003). De plus, il a été montré que la ribavirine inhibe la réplication du virus HeV *in vitro*, en fonctionnant comme un agent

mutagène (Eaton, Broder, and Wang, 2005; Wright, Crameri, and Eaton, 2005). Cependant, deux études réalisées chez le hamster et le singe ont remis en cause ces résultats. En effet, la ribavirine n'est pas efficace chez le hamster pour inhiber la réplication du virus NiV et HeV (Freiberg *et al.*, 2010; Georges-Courbot *et al.*, 2006). Chez le singe vert africain, un traitement à la ribavirine réalisé après infection par le virus HeV n'a fait que retarder la mort de ces animaux (Rockx *et al.*, 2010). La chloroquine a également été utilisée pour traiter une infection par les Hénipavirus chez le hamster et le furet mais sans succès (Freiberg *et al.*, 2010; Pallister *et al.*, 2009). En revanche, la molécule poly(I)-Poly(C₁₂U) permet de prévenir en partie la mort des hamsters après une infection létale par le virus NiV (Georges-Courbot *et al.*, 2006). En effet, le poly(I)-Poly(C₁₂U) est un agoniste du TLR3 en mimant une molécule d'ARN db et permet l'activation de la réponse IFN. Ceci suggère un rôle important de la réponse innée dans la protection des animaux contre l'épreuve virale (Ichinohe *et al.*, 2007; Padalko *et al.*, 2004). À ce jour, aucune étude supplémentaire n'a été réalisée sur ces deux molécules.

4.6.2 Peptides antiviraux

Une autre approche consiste à développer des molécules inhibitrices permettant d'empêcher l'attachement ou la fusion du virus à la membrane cellulaire. Comme décrit dans le précédent paragraphe, la protéine F possède deux domaines HR impliqués dans le rapprochement des membranes virales et cellulaires (Figure 26). Le développement de peptides issus du domaine HR de la protéine F des virus HeV et NiV a montré leur capacité à inhiber la fusion virale (Bossart *et al.*, 2002; Eaton, Broder, and Wang, 2005; Lambert *et al.*, 1996). Ainsi, l'association de HR1 et HR2 durant le processus de fusion peut être inhibée à l'aide des peptides synthétiques correspondants au domaine HR2. Toutefois, la nature hydrophobe et la grande taille (42 a.a) de ces peptides limitent leur utilisation *in vivo*. Des peptides de deuxième génération, de plus petites tailles (32 a.a) et associés à du polyéthylène glycol, ont donc été produits. Ces peptides très solubles inhibent la fusion et l'infection des Hénipavirus à des concentrations similaires à celles utilisées pour les peptides non modifiés de grande taille et, sont aussi efficaces que ces derniers (Bossart *et al.*, 2005b). Dans une approche parallèle, une protéine EphrinB2 modifiée, sécrétée dans le milieu extracellulaire et capable de se fixer sur la protéine G à la surface des Hénipavirus et d'interférer avec l'attachement du virus à la membrane cellulaire a été développée (Bonaparte *et al.*, 2005). À ce jour, aucun de ces deux procédés n'a pas été évalué *in vivo*.

4.6.3 Immunisation passive

4.6.3.1 Anticorps murins

L'administration passive d'anticorps neutralisants chez des personnes infectées peut également se révéler efficace comme traitement juste après une infection. Le premier essai de thérapie passive contre le virus NiV a été effectué avec des anticorps polyclonaux de hamsters. Des hamsters ont été protégés par injection d'anticorps polyclonaux produits chez un animal préalablement vacciné. Ces anticorps ont été injectés 1 h avant l'infection par le virus NiV et 24 h après. Une protection totale des animaux contre l'infection mortelle a été observée (Guillaume *et al.*, 2004b). Afin d'améliorer la disponibilité de ces anticorps et d'augmenter leur efficacité, une banque d'anticorps monoclonaux a été réalisée contre les protéines F et G du virus NiV (V.Guillaume et I.Grosjean, INSERM U758/IBCP). Deux anticorps murins (mAc) spécifiques de la protéine G (Nip GIP 1.7 et Nip 3B10) et deux anticorps spécifiques de la protéine F (Nip GIP 35 et Nip GIP 3) ont été sélectionnés pour leur pouvoir neutralisant *in vitro* contre les virus NiV et HeV. Ces anticorps ont été administrés 1 h après l'infection des hamsters par le virus NiV et ont protégés tous les animaux infectés. En revanche, l'administration de ces mAc 24 h après l'infection n'a protégé que 50 % des animaux et l'administration des anticorps dirigés contre la protéine G à des temps plus tardif n'a pas fonctionné (Guillaume *et al.*, 2006b). Malgré tout, les mAc dirigés contre la protéine F administrés 96 h après l'infection ont permis une protection de 50 % des animaux (Guillaume *et al.*, 2006b). De plus, certains de ces mAc dirigés contre la protéine F ou G du virus NiV peuvent également reconnaître le virus HeV et le neutraliser. Ainsi, l'injection de ces anticorps 1 h avant et 24 h après l'injection du virus HeV chez des hamsters a montré que l'anticorps mAc GIP21, anticorps dirigés contre la protéine F du virus NiV, a permis de protéger presque la totalité des animaux infectés par le virus HeV (Guillaume *et al.*, 2009).

4.6.3.2 Anticorps humanisés

D'autres études se sont consacrées à l'utilisation d'anticorps humanisés. En effet, des anticorps murins fonctionnent moins efficacement chez l'homme que des anticorps humanisés. Ainsi, des anticorps spécifiques de la protéine G du virus HeV ont été sélectionnés par la technique de « *phage display* ». Brièvement, une protéine G soluble du virus HeV a été mise en contact avec une librairie contenant 10^{10} fragments Fab d'anticorps humains. Rappelons que la partie Fab d'un anticorps comprend la partie supérieure de l'anticorps soit les chaînes lourdes et légères qui sont spécifiques d'un antigène. Sept fragments Fab humains monoclonaux (hMAb), annotés de m101 à m107, ont été sélectionnés sur la base de critères tels que leur capacité de liaison à la protéine G soluble ou

à un peptide dérivé de la protéine. Parmi ces fragments Fab, les fragments m101, m102 et m106 ont montré leur capacité à inhiber la fusion de cellules infectées par les virus HeV ou NiV (Zhu *et al.*, 2006). Les anticorps Fab sont plus efficaces quand ils possèdent la partie Fc, c'est à dire la partie constante de l'anticorps. Un anticorps complet de type IgG1, ayant pour partie constante le fragment m101, a montré une forte capacité à inhiber le virus HeV. De même, l'anticorps m102 neutralise aussi bien le virus NiV que le virus HeV et se lie le plus efficacement aux protéines G de ces deux virus, notamment au niveau du domaine de liaison au récepteur EphrinB2. Cet anticorps a fait l'objet d'une maturation supplémentaire *in vitro* afin d'augmenter son pouvoir neutralisant contre les virus HeV et NiV. Ainsi, un anticorps IgG1 m102.4 a été obtenu après plusieurs cycles de sélection (Zhu *et al.*, 2008). Cet anticorps est toujours capable de se lier à la protéine G des virus HeV et NiV, et inhibe efficacement leur activité même avec une faible quantité de protéine utilisée. Cependant, il semble que cet anticorps soit plus efficace contre le virus NiV que contre le virus HeV.

L'efficacité de l'anticorps m102.4 a ensuite été évaluée *in vivo* chez le furet infecté par le virus NiV. L'anticorps a été administré chez l'animal 24 h avant ou 10 h après une infection par le virus NiV par voie intraveineuse et tous les animaux ont survécu à l'infection (Zhu *et al.*, 2008). L'efficacité de cet anticorps en thérapie passive post-exposition a ensuite été évaluée sur le modèle de singe vert africain infecté par le virus HeV. Des singes ont été infectés par le virus HeV puis ont reçu une dose d'anticorps 10 h, 24 h ou 72 h après l'infection. Une seconde injection d'anticorps a été réalisée 48 h après la première injection. Tous les animaux ont survécu à l'infection et il n'y a pas eu dissémination du virus dans l'organisme. Seuls les animaux ayant reçu la première dose à 72 h ont développé quelques signes neurologiques mais ils ont commencé à récupérer 16 jours après l'infection (Bossart *et al.*, 2011). L'anticorps m102.4 a montré de nombreuses caractéristiques importantes pour une utilisation en essais clinique. En effet, il peut neutraliser les deux virus NiV et HeV et possède une longue demi-vie, et il protège les animaux de l'infection même lorsqu'il est administré 72 h après l'infection. Cet anticorps constitue un traitement thérapeutique intéressant s'il est injecté rapidement. Ces travaux sont très encourageants pour de futures applications cliniques.

D'autres traitements antiviraux pourraient être développés pour cibler la muqueuse des poumons, un des sites privilégiés de l'infection, et agir afin de réduire la charge virale. Un autre point également important serait de délivrer les agents thérapeutiques par voie sanguine pour réduire la dissémination du virus dans l'organisme. Pour l'instant, les seuls traitements testés ciblent l'entrée du virus en agissant soit avant l'infection, soit comme traitement après une exposition. Cependant, malgré de nombreuses expériences, aucun traitement n'est disponible. De plus, compte tenu de la dissémination rapide du virus dans l'organisme, ce type de traitement ne serait pas le plus efficace pour lutter contre une

infection par les Hénipavirus. En effet, le traitement est le plus efficace contre l'infection virale s'il est administré au maximum 24 h après infection chez les singes. Chez l'homme, la fenêtre d'efficacité du traitement pourrait être encore plus courte. Face à ces limitations, de nombreuses équipes se sont intéressées au développement d'un vaccin permettant la mise en place d'une protection avant la rencontre avec le pathogène.

4.7 VACCINATION CONTRE LES HÉNIPAVIRUS

4.7.1 Vaccin à ADN

Une seule étude a porté sur une vaccination par immunisation avec de l'ADN. Des souris ont été immunisées avec deux plasmides portant les gènes *G* et *F* du virus NiV. Ces plasmides ont été injectés séparément ou ensemble. Les souris ont développé des anticorps spécifiques des protéines F et G et en particulier des anticorps neutralisants. L'injection du plasmide codant pour la protéine G est plus efficace pour induire des réponses humorales que celui codant pour la protéine F (Wang *et al.*, 2006). Il s'agit de la seule étude de vaccination contre les Hénipavirus basée sur un vaccin génétique qui ait été réalisée en date.

4.7.2 Vaccin sous unitaire utilisant la protéine G soluble

Afin de caractériser les mécanismes d'infection des Hénipavirus, deux équipes ont développé des protéines G modifiées des virus NiV et HeV, afin de les rendre solubles et de pouvoir les utiliser respectivement dans des tests *in vitro* ou comme protéine soluble en vaccination.

La première équipe a mis au point une protéine G du virus NiV tronquée de 57 kDa et constituée uniquement du domaine extracellulaire raccourci de quelques a.a. La séquence de cette protéine a été clonée dans un génome baculoviral et la protéine a été purifiée en grande quantité à partir de cellules d'insectes infectées (Figure 28) (Eshaghi *et al.*, 2004). Bien que les cellules Sf9 utilisées dans cette technique soient capables d'effectuer quelques modifications post-traductionnelles de la protéine G, la taille de la protéine observée en WB ne correspond pas à celle observée pour la protéine G tronquée ayant subi toutes les modifications traductionnelles typiques de cellules de mammifères. En effet, comme nous l'avons vu précédemment, la protéine G possède de nombreux sites de N-glycosylations dont 5 situés au niveau de l'ectodomaine (présent entre les a.a 306 et 529), et chaque site augmente la taille de la protéine de 2 à 4 kDa (Bowden *et al.*, 2008b). Ainsi, la différence de taille observée entre l'ectodomaine non-glycosylé (57 kDa) et l'ectodomaine glycosylé (estimé à environ 67 kDa) indique que la protéine G tronquée observée en WB n'est que très

peu glycosylée. Ce manque de glycosylations pourrait avoir un effet sur la détection des épitopes habituellement cachés par les glycosylations par le système immunitaire, en augmentant l'immunogénicité de la protéine avec le risque que les AcN ainsi formés soit inefficace contre le virus sauvage. Une autre différence réside dans le fait que l'ectodomaine n'a pas été conservé dans sa totalité, ce qui pourrait interférer avec le repliement correct de cette protéine tronquée.

En 2005, l'équipe de C. Bossart a développé des protéines G soluble (Gs) des virus NiV et HeV capables d'être sécrétées dans le surnageant cellulaire (Bossart *et al.*, 2005a). Pour cela, la protéine G membranaire a été modifiée de telle sorte que les domaines cytoplasmiques et transmembranaires ont été supprimés. À la différence de la précédente construction, le domaine extracellulaire a été conservé dans sa totalité et un peptide signal permettant la sécrétion de la protéine a été ajouté en position N-term. De plus, une étiquette « peptide S » pouvant interagir avec la protéine S (Ribonucléase A) a été ajoutée afin de pouvoir purifier cette protéine soluble plus facilement (Figure 28).

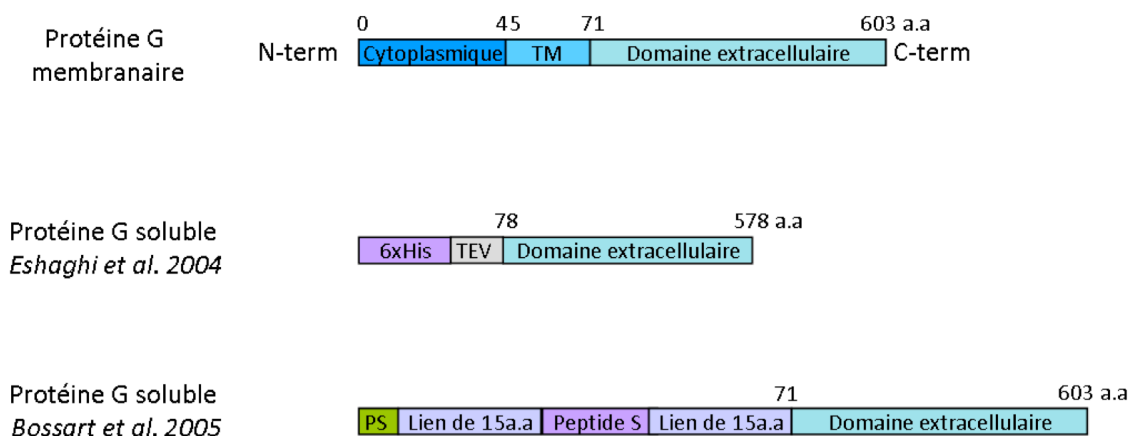


Figure 28. Représentation schématique des différentes protéines G solubles développées

La protéine G sauvage membranaire est composée des domaines cytoplasmique, transmembranaire (TM) et extracellulaire. Dans les deux constructions développées, les domaines cytoplasmiques et TM ont été supprimés. La protéine G soluble développée par *Eshaghi et al.* possède un domaine extracellulaire raccourci de 7 a.a en N-term et de 25 a.a en C-term. Cette protéine possède une étiquette 6xhistidine (6xHis) en position N-term, séparée du reste par une séquence de clivage par la protéase du virus de la Gravure du Tabac ou TEV. Par contraste, la protéine G soluble créée par *Bossart et al.* possède un domaine extracellulaire intact. En position N-term, un peptide signal (PS) permet la sécrétion de la protéine, et une étiquette peptide S encadrée de part et d'autre par deux séquences de jonction (« linker ») de 15 a.a a également été ajoutée en position N-term de la protéine.

De courtes séquences (15 a.a) ont été insérées entre les différents domaines afin de ne pas gêner le repliement de l'ectodomaine de la protéine G. La séquence codante de cette protéine modifiée a été insérée dans un vecteur viral afin d'obtenir un virus de la Vaccine recombinant. Des cellules de mammifères ont été infectées et la protéine Gs recueillie dans le surnageant de cultures cellulaires. La taille de la protéine modifiée est d'environ 80 kDa, ce qui correspond à la taille attendue avec la totalité des modifications post-traductionnelles. Elle possède toujours la capacité de former des monomères, des dimères et des tétramères mais la forme dimérique est majoritaire dans le surnageant. Les dimères sont liés par des ponts-disulfures, comme pour la protéine G membranaire sauvage (Bowden *et al.*, 2008a; Harcourt *et al.*, 2000; Yu *et al.*, 1998). De plus, la protéine G du virus HeV modifiée est capable de reconnaître le récepteur EphrinB2, de se lier à lui et d'empêcher la fusion cellulaire après une infection par les virus NiV ou HeV. Un test réalisé chez le lapin a montré que l'injection de la protéine Gs du virus HeV a permis d'induire le développement d'anticorps neutralisants contre la protéine G des virus HeV et NiV (Bossart *et al.*, 2005a).

La protéine Gs dérivée du virus HeV a été évaluée *in vivo* chez de nombreux modèles animaux. Des chats ont été immunisés à trois reprises avec soit la protéine Gs du virus HeV soit celle du virus NiV, couplée à des adjuvants et deux mois après la dernière immunisation, les animaux ont été infectés par le virus NiV (Mungall *et al.*, 2006). Tous les animaux ont survécu à l'infection mortelle sans montrer de signes cliniques et sans détection du virus dans les organes. Cette technique de vaccination utilisant une protéine Gs des virus NiV ou HeV, a permis d'obtenir des titres en anticorps neutralisants très importants jusqu'à deux mois après la dernière immunisation. De plus, les anticorps anti-Gs du virus HeV sont cross-neutralisants car ils peuvent également neutraliser le virus NiV. En revanche, les anticorps neutralisants développés contre la protéine Gs du virus NiV, n'inhibent que faiblement le virus HeV *in vitro* (Mungall *et al.*, 2006).

De ce fait, la protéine Gs du virus HeV a été par la suite utilisée de façon préférentielle pour des expériences de protection chez le chat ou le furet (McEachern *et al.*, 2008; Pallister *et al.*, 2011b). Chez ces animaux, deux injections de protéines Gs avec adjuvants sont nécessaires pour obtenir des titres en AcN élevés. De plus, il est important de noter que l'injection des Hénipavirus a été réalisée au sommet de la réponse anticorps, lorsque la protection était maximale. Cette réponse humorale permet de protéger les animaux contre une épreuve virale sans que ces derniers ne développent de signes cliniques, à l'exception du furet qui a été traité avec une faible dose de protéine. Pour la majorité des furets testés, aucun ARN des virus n'a été détecté dans les organes mais chez les chats, le virus a été détecté dans le cerveau. De plus, chez certains animaux vaccinés par une faible dose de protéines, le titre en AcN a augmenté après l'infection virale, avec détection d'anticorps dirigés contre un autre antigène du virus, indiquant une réplication du virus dans

l'organisme vacciné. Bien qu'il soit difficile de comparer ces expériences qui ont été réalisées dans des conditions très différentes, ces résultats suggèrent dans l'ensemble qu'une forte dose de protéine Gs du virus HeV permet de protéger les animaux contre l'apparition des signes cliniques et empêche la réplication du virus alors qu'une dose plus faible limite la réplication virale.

Récemment, deux études ont été réalisées chez des primates non-humains vaccinés par la protéine Gs HeV et infectés par NiV ou HeV (Broder *et al.*, 2012b). Tous les animaux vaccinés par ce procédé ont survécu à l'infection. Ainsi, cette protéine a montré sa capacité à induire des réponses humores et à protéger de nombreuses espèces animales contre des infections par les Hénipavirus. Une société multinationale a récemment obtenu une licence pour l'utilisation de ce vaccin chez les chevaux en Australie et a donc pu réaliser une étude de vaccination chez ces animaux. Les chevaux vaccinés ont été protégés contre une dose mortelle de virus HeV, n'ont pas développé de signes cliniques et aucune réplication virale n'a été détectée. D'autres études sont en cours pour valider l'utilisation de ce vaccin chez l'homme (Broder *et al.*, 2012b).

4.7.3 Les vaccins utilisant des VLP

Des pseudoparticules formées par la protéine de matrice M et portant à leur surface les glycoprotéines d'enveloppe F et G du virus NiV ont été développées (voir Introduction, Chapitre 2.5) (Walpita *et al.*, 2011). L'infection de cellules par les VLP-NiV *in vitro* induit la formation de syncytia qui est inhibée en présence d'anticorps polyclonaux anti-NiV. L'injection de ces VLP *in vivo* chez la souris par voie SC, permet le développement d'une réponse IgG spécifique mais une forte dose est nécessaire pour l'obtention d'AcN. Ces VLP n'ont pas été testées lors d'une épreuve virale réalisée avec les virus NiV ou HeV.

4.7.4 Les vaccins génétiques utilisant les vecteurs viraux

La première étude de vaccination utilisant des vecteurs viraux a été réalisée en 2004. Des hamsters ont été immunisés par un vecteur recombinant issu du virus de la Vaccine, codant soit pour la protéine G soit pour la protéine F du virus NiV, ou par les deux vecteurs en même temps (Guillaume *et al.*, 2004b). La souche NYVAC, précédemment décrite (voir Introduction, Chapitre 2.1.3), a été utilisée dans cette publication. Ces vecteurs ont été administrés par voie SC à deux reprises à 1 mois d'intervalle. Deux injections sont nécessaires pour le développement d'AcN et l'injection du vecteur codant pour la protéine G permet l'obtention des meilleurs titres en IgG et en AcN. Ces animaux vaccinés ont été infectés par voie IP avec 1000 pfu de virus NiV par animal. Les animaux contrôles ont été

euthanasiés 6 à 8 jours après injection suite à l'apparition de signes cliniques sévères. En revanche, tous les animaux vaccinés ont survécu à l'épreuve virale, que ce soit avec la simple immunisation ou l'injection des deux vecteurs en même temps et ce jusqu'à 5 mois après injection. Concernant les anticorps anti-NiV après l'épreuve virale, une augmentation des IgG et des AcN est visible. La présence du virus circulant dans le sang des animaux a été évaluée par qPCR et le virus est détecté uniquement dans les animaux contrôles à 5 et 6 jours post-infection avec une quantité allant de 2.10^5 à 2.10^6 copies d'ARN du virus NiV par mL. L'augmentation des anticorps anti-NiV observée après l'injection du virus NiV suggère que, malgré le fait que les animaux n'aient développé aucun symptôme, le virus s'est quand même répliqué dans l'organisme (Guillaume *et al.*, 2004b). La présence du virus n'a pas été recherchée dans les organes des animaux et aucun autre test n'a été réalisé pour vérifier cette hypothèse. En conclusion, un virus de la Vaccine de souche NYVAC codant pour la protéine G ou F du virus NiV est capable de protéger des hamsters contre les symptômes de l'infection mais la réponse humorale développée ne permet pas d'inhiber la réplication virale.

Un vecteur viral Canarypox de type ALVAC (voir Introduction, Chapitre 2.1.4) a été par la suite utilisé pour vacciner des porcs contre le virus NiV (Weingartl *et al.*, 2006). Deux vecteurs codant respectivement pour la protéine G et la protéine F du virus NiV ont été développés. Ces deux vecteurs ont été injectés séparément ou simultanément chez des porcs. Une deuxième injection de vecteurs a été réalisée 14 jours après la première immunisation. La présence d'AcN est détectée 14 jours après la 1^{ère} injection et est maximale 14 jours après la deuxième injection de vecteurs. Le vecteur ALVAC-F donne les titres en AcN anti-NiV les plus faibles. Les anticorps produits sont spécifiques du virus NiV et inhibent son infection *in vitro*, en revanche ces anticorps sont peu cross-neutralisants et n'inhibent que très légèrement le virus HeV (1 animal sur 4 pour ALVAC-F ou ALVAC-G). L'administration de virus NiV par voie IN à $2,5.10^5$ pfu par animal a été réalisée au sommet de la réponse AcN, 14 jours après la dernière immunisation. Après l'épreuve virale, aucun des animaux vaccinés n'a pas développé de signes cliniques, en revanche, des animaux contrôles ont développé des symptômes 7 jours après infection. Les titres en IgG et en AcN n'ont pas augmenté après l'infection. Une vaccination par le vecteur ALVAC-G ou la combinaison des deux vecteurs prévient la dissémination du virus dans l'organisme. En effet, aucun ARN viral n'a été détecté dans les organes des animaux vaccinés par ALVAC-G. De plus, le vecteur ALVAC induit une réponse de type Th1 comme le montre la production des cytokines IL-10, TNF- α et IFN- γ . Ainsi, le vecteur ALVAC recombinant permet de protéger les animaux contre l'apparition des symptômes de l'infection et il empêche également le virus de se répliquer. Par contre, seuls les 7 premiers jours après l'infection par le virus NiV ont été étudiés, alors que la stimulation de la réponse anticorps semble apparaître 11 à 14 jours

post-infection. Ainsi, le vecteur ALVAC semble établir une immunité stérilisante mais ceci reste à confirmer.

Enfin, deux autres vecteurs viraux ont été étudiés mais uniquement chez la souris et aucune évaluation de la protection n'a été réalisée contre une infection par le virus NiV. Un vecteur viral VSVΔG codant pour la protéine F ou G du virus NiV a été développé (voir Introduction, Chapitre 2.2) (Chattopadhyay and Rose, 2011). Les vecteurs VSVΔG-F ou VSVΔG-G ou les deux vecteurs ensemble, ont été injectés à des souris par voie IM. Une réponse AcN dirigée contre le virus NiV a été observée pour les 3 conditions mais l'injection des deux vecteurs en même temps induit la plus forte réponse. De plus, le vecteur exprimant la protéine G donne de meilleures réponses que le vecteur codant pour la protéine F. Cette réponse humorale est toujours présente et reste stable 3 mois après une seule immunisation. Le deuxième vecteur utilisé chez la souris est le VEE (voir Introduction, Chapitre 2.3). Des VRP (*VEE Replicon Particle*) codant pour les protéines F ou G des virus NiV ou HeV ont été développées et injectées au niveau du coussinet plantaire de la souris (Defang *et al.*, 2011). Trois immunisations ont été réalisées aux semaines 0, 5 et 18. La première injection a permis le développement d'une réponse IgG spécifique du virus ciblé et deux injections de vecteurs ont été nécessaires pour atteindre le maximum de la réponse AcN. Les protéines F et G du virus HeV induisent les meilleures réponses cross-neutralisantes.

En conclusion sur les différents traitements ou essais de vaccination contre les Hénipavirus, plusieurs points sont à souligner. L'anticorps humain m102.4 est capable de cross-neutraliser efficacement les deux virus s'il est injecté 72 h après exposition chez le primate. Cet anticorps apporte un nouvel espoir pour un traitement en cas de contamination du personnel de laboratoire et est en cours de développement clinique aux USA et en Australie. Cependant, ce traitement ne peut être efficace que dans une fenêtre de temps restreinte, avant que le virus n'ait le temps de se répliquer et de se diffuser dans les organes. En termes de vaccination la protéine Gs développée semble très prometteuse car elle protège les animaux contre l'apparition des symptômes de la maladie et empêche également la réplication virale aussi bien du virus NiV que du virus HeV. Il est à noter cependant que cette technique de vaccination nécessite plusieurs injections de fortes doses de protéine purifiée couplée à des adjuvants. Ce vaccin sera probablement utilisé dans quelques années comme vaccin vétérinaire chez le cheval en Australie. Plusieurs injections du vaccin ont aussi été requises pour obtenir une réponse humorale forte dans les quelques études de vaccination employant des vecteurs viraux. Enfin, dans ce cas, comme lors de l'utilisation de protéine Gs, des études plus approfondies seraient nécessaires, notamment

pour tester le niveau de protection obtenu à différents temps après vaccination, en particulier avant l'apparition d'Ac et après le pic de réponse humorale. Enfin, il faut remarquer qu'aucune étude de vaccination n'a pour l'instant explorée l'induction de réponses cellulaires et leur rôle dans la protection des animaux. De plus, concernant les vecteurs viraux, toutes les études de protections ont été réalisées contre le virus NiV mais aucune n'a été réalisée contre le virus HeV. De plus, un vecteur codant pour la protéine G donne de meilleures réponses humorales qu'un vecteur codant pour la protéine F.

Un vaccin idéal dirigé contre les Hénipavirus doit pouvoir être injecté en une seule fois, et permettre le développement d'une réponse immunitaire forte capable de protéger les animaux et les hommes aussi bien à des temps précoces qu'à des temps tardifs par rapport au moment de la vaccination. De plus, ce vaccin doit idéalement pouvoir protéger les animaux aussi bien contre le virus NiV que contre le virus HeV, en induisant une immunité stérilisante afin d'éliminer le virus de l'organisme sans lui laisser le temps de se répliquer. Les vaccins présentés ci-dessus doivent encore être améliorés et plus particulièrement les vaccins utilisant des vecteurs viraux.

RÉSULTATS

OBJECTIFS DE TRAVAIL

Le potentiel des vecteurs AAV comme nouveaux outils de vaccination n'est exploré que depuis quelques années. Comme nous l'avons vu dans l'introduction, ces vecteurs ont été utilisés dans plusieurs études vaccinales dirigées contre des infections virales comme HPV, HIV ou encore contre le virus de la grippe. Ces études ont démontré que les vecteurs AAV peuvent induire des réponses humores et cellulaires contre le produit du transgène. Les réponses observées dépendent de nombreux facteurs comme la nature du transgène, la voie d'administration, le sérotype d'AAV utilisé ou encore le modèle animal choisi. De plus, très peu d'études ont montré que les vecteurs AAV peuvent induire des réponses immunitaires capables de protéger des animaux contre une épreuve virale.

Le but de ce travail a été d'apporter une contribution à ces études, en améliorant la compréhension et la caractérisation des réponses immunitaires et plus particulièrement la réponse humorale engendrée par l'injection de vecteurs AAV *in vivo*. En particulier, le potentiel des vecteurs AAV a été évalué comme outil de vaccination dans un contexte de maladies virales émergentes.

Parmi les nombreux virus émergents de cette dernière décennie, le virus NiV et le virus HeV sont des cibles de vaccination importantes. En effet, ces virus du genre des Hénipavirus représentent un risque biologique majeur tant par la forte mortalité qu'ils induisent que par leur large tropisme et leur présence dans de nombreuses régions géographiques. De plus, ils peuvent être détournés et utilisés comme armes biologiques à des fins de bioterrorisme. Les virus NiV et HeV possèdent une forte identité de séquence, notamment au niveau du gène codant la glycoprotéine d'enveloppe G. Pour ces deux virus, cette protéine est très immunogène et induit des réponses humores fortes avec développement d'anticorps neutralisants. De ce fait, de nombreuses stratégies de vaccination ont porté sur l'administration directe de la protéine G soluble du virus NiV ou HeV chez l'animal. En parallèle, un certain nombre de vecteurs recombinants codant pour la protéine G du virus NiV ou HeV ont été développés comme vaccins génétiques.

Cet antigène a été utilisé pour évaluer la capacité des vecteurs AAV à induire le développement d'une immunité humorale protectrice.

Dans la première partie de ce projet, des vecteurs AAV codant pour la protéine G du virus Nipah (AAV-NiV.G) ont été développés ainsi que les outils permettant la détection et la

caractérisation des anticorps spécifiques de cet antigène. La deuxième partie de ce projet a été consacrée à une première caractérisation des réponses humorales induites par les vecteurs AAV-NiV.G chez la souris.

Enfin, la dernière partie de ce projet a eu pour objectif de valider le pouvoir protecteur des vecteurs AAV-NiV.G en utilisant le hamster doré (*Mesocricetus auratus*) comme modèle animal. En effet, contrairement à la souris, le hamster est sensible à l'infection par les Hénipavirus et développe des symptômes similaires à ceux observés chez l'homme. Ces animaux ont été immunisés par les vecteurs AAV-NiV.G puis infectés par les Hénipavirus au sein du laboratoire P4 Jean Mérieux de Lyon. Ce travail de recherche a donné lieu à une publication.

1. DÉVELOPPEMENT DES OUTILS

Les vecteurs AAV recombinants portant la séquence codante de la protéine G du virus Nipah ont été construits et les particules d'AAV-NiV.G produites. Leurs fonctionnalités ont été vérifiées *in vitro* avant leur injection chez l'animal.

Afin de mesurer les réponses humorales induites par l'injection de ces vecteurs, deux techniques permettant la détection des anticorps anti-NiV.G ont été développées. En effet, à ce jour il n'existe aucun test commercialisé. Les seules techniques disponibles au début de ce projet comportaient l'utilisation de virus NiV sauvage ou d'extraits de cellules infectées et devaient donc être réalisées dans le laboratoire P4. Pour s'affranchir de ces contraintes, nous avons développé un test ELISA en utilisant une protéine G soluble pour la détection des immunoglobulines (Ig) dirigées contre cet antigène. De plus, un test de détection d'anticorps neutralisants anti-NiV a également été mis au point en utilisant des pseudo-particules rétrovirales.

1.1 LES VECTEURS AAV-NiV.G

1.1.1 Construction du plasmide AAV codant pour la protéine G du virus Nipah

La construction du plasmide vecteur AAV portant la séquence codante de la glycoprotéine G du virus Nipah a été réalisée dans le laboratoire. La cassette d'expression NiV.G provenant du plasmide pHCMV-NiV.G a été insérée dans le vecteur AAV SSV9 (Figure 29). Ce plasmide pAAV-NiV.G contient : 1) les répétitions terminales inversées de l'AAV de sérotype 2 (ITR-2) indispensables pour la réplication du vecteur et son encapsidation dans la

capside virale, 2) le promoteur du cytomégalo virus (CMV), 3) un intron du gène de la γ globine de poulet, 4) la séquence codante NiV.G et 5) un site de poly-adénylation (polyA) provenant de la β globine de lapin.

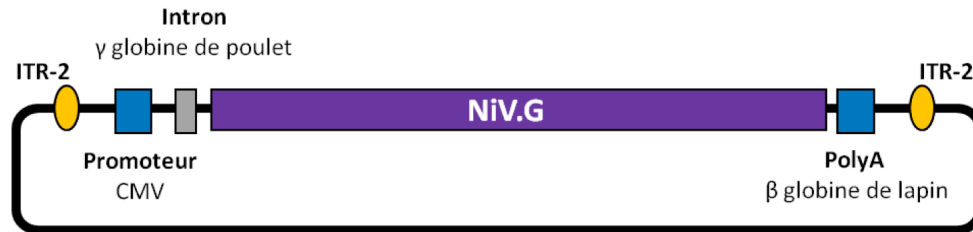


Figure 29. Structure du plasmide AAV codant pour la protéine G du virus Nipah

Des vecteurs AAV codant pour des protéines telles que la « *Green Fluorescent Protein* » (GFP) et la phosphatase alcaline murine sécrétée (mSEAP) déjà disponibles au laboratoire, ont été utilisés comme contrôles négatifs pour les expériences *in vitro* et *in vivo* (Gambotto *et al.*, 2000; Maelandsmo *et al.*, 2005; Stripecke *et al.*, 1999).

1.1.2 Validation des vecteurs AAV-NiV.G *in vitro*

Trois sérotypes d'AAV ont été produits après validation *in vitro* du plasmide pAAV-NiV.G : l'AAV2/1-NiV.G, l'AAV2/8-NiV.G et l'AAV2/rh32.33-NiV.G (voir Annexe 1). Le choix de ces sérotypes est expliqué dans le paragraphe 2. Afin de simplifier la nomenclature de ces vecteurs, les particules seront nommées comme suit : AAV1-NiV.G, AAV8-NiV.G et AAVrh32.33. Les titres des particules obtenus au cours des différentes productions varient entre 1.10^{12} et 1.10^{13} gp/mL, quel que soit le sérotype utilisé. Parallèlement, des particules d'AAV de ces trois sérotypes, codant pour les protéines GFP ou mSEAP, ont été produites et utilisées comme contrôles négatifs dans les expériences *in vitro* et *in vivo*.

Afin de vérifier l'expression et la fonctionnalité de la protéine NiV.G produite à partir de ces vecteurs AAV, plusieurs tests ont été réalisés. La localisation membranaire de la protéine G a été vérifiée par immunofluorescence indirecte (IF) et cytométrie en flux (Figure 30). Des cellules 293SZ ont été co-infectées par l'AAV1-NiV.G et l'Ad-dl324 puis marquées par l'anticorps polyclonal 1.7 (ascite) spécifique de la protéine G (voir Résultats, Chapitre 1.2.2). L'analyse par cytométrie en flux a mis en évidence la présence de la protéine G à la membrane des cellules infectées (Figure 30A). L'analyse par IF a confirmé la localisation membranaire de cette protéine (Figure 30B). Ces tests n'ont pas été réalisés avec les deux autres sérotypes d'AAV.

Le test de fusion a permis d'évaluer la fonctionnalité de la protéine G. En effet, la présence des deux glycoprotéines d'enveloppe F et G du virus Nipah, à la surface de cellules possédant le récepteur membranaire EphrinB2 permet la formation de cellules géantes multinuclées aussi appelées syncytia (Tamin *et al.*, 2002). Pour réaliser ce test, des cellules 293SZ possédant le récepteur EphrinB2 ont été transfectées avec un plasmide pHCMV-NiV.F codant pour la protéine F du virus Nipah.

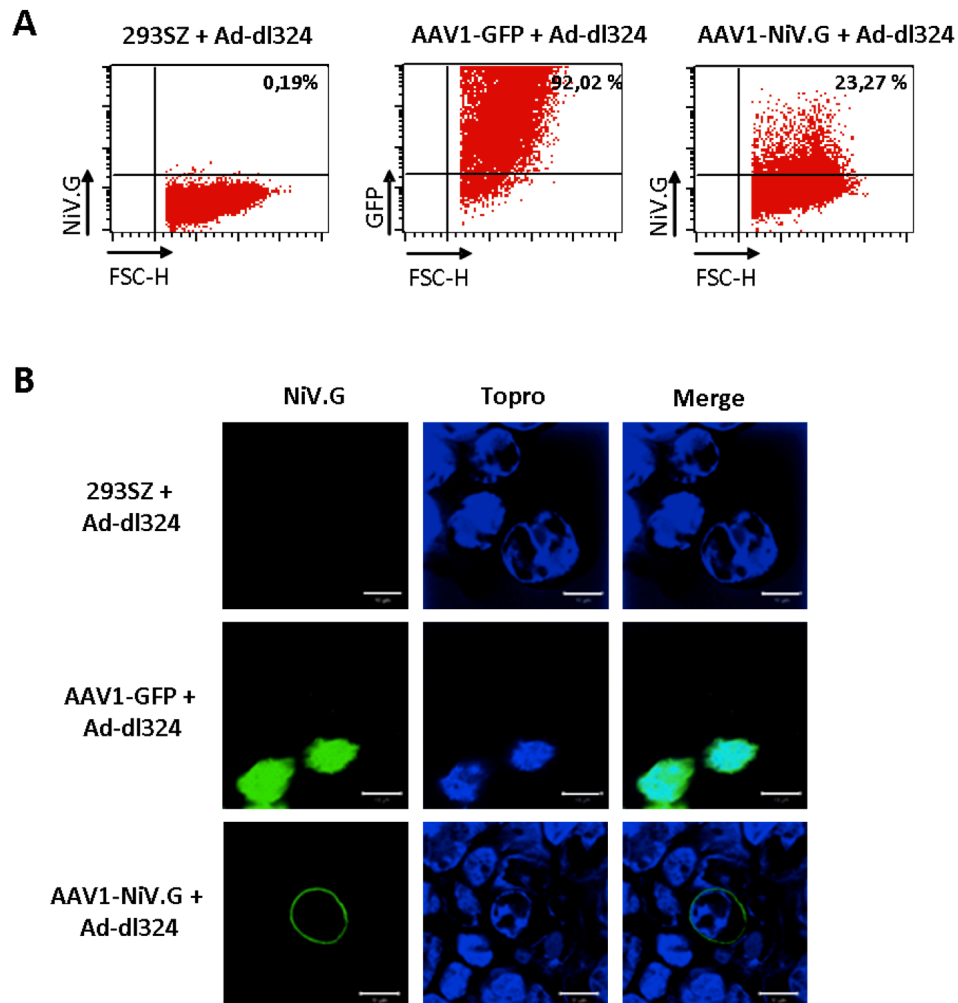


Figure 30. Détection de la protéine G à la membrane cellulaire *in vitro*

Des cellules 293SZ ont été co-infectées par les vecteurs AAV1-NiV.G ou AAV1-GFP à une multiplicité d'infection (MOI) de 1.10^4 gp par cellule et par l'Ad-dl324 à une MOI de 5 particules infectieuses par cellule (pi/c). Les cellules ont été marquées 36 h après infection par l'anticorps polyclonal anti-NiV.G 1.7, puis révélées par un marquage secondaire au fluorochrome Alexa fluor 488. **A.** Détection par cytométrie en flux de la protéine G à la surface des cellules. **B.** Détection par IF de la protéine G à la membrane des cellules au microscope confocal. La barre blanche située en bas à droite de chaque image représente 10 μ m.

Ces cellules ont ensuite été infectées par les différents vecteurs AAV-NiV.G et par un Adénovirus défectif pour la réplication (Ad-dl324) afin d'augmenter la vitesse de production de la protéine G. La formation de syncytia a été observée 24 h après infection (Figure 31).

Le test de fusion montre que la protéine G du virus Nipah produite par les 3 vecteurs AAV est fonctionnelle, puisqu'elle permet de faire fusionner deux membranes cellulaires voisines avec l'aide de la protéine F.

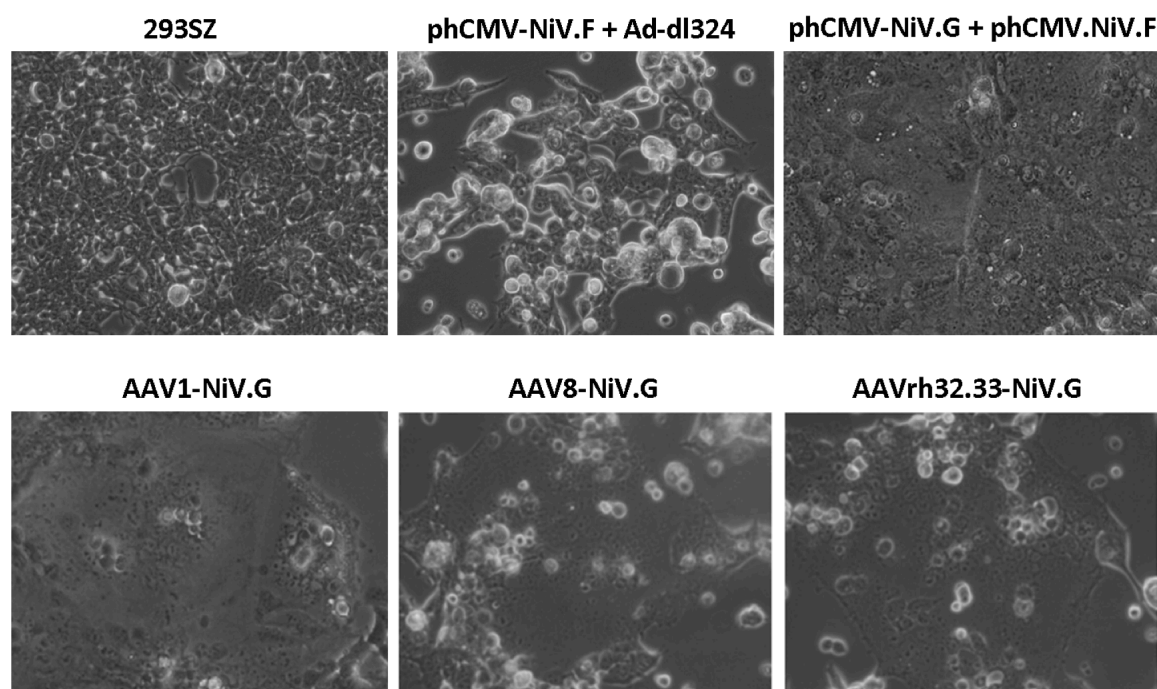


Figure 31. Test de fonctionnalité des AAV-NiV.G *in vitro*

Des cellules 293SZ ont été transfectées par le plasmide phCMV-NiV.F puis co-infectées par les vecteurs AAV1-NiV.G, AAV8-NiV.G et AAVrh32.33-NiV.G ($\text{MOI } 1.10^5$) et par l'Ad-dl324 ($\text{MOI } 5$). La co-transfection des plasmides phCMV-NiV.G et phCMV-NiV.F a été utilisée comme contrôle positif. Des cellules transfectées par le plasmide phCMV-NiV.F seul ont été utilisées comme contrôle négatif. Des syncytia sont visibles 24 h après infection. Observations réalisées sur un microscope optique avec un grossissement de 200x.

En conclusion, ces expériences ont confirmé la localisation membranaire de la glycoprotéine d'enveloppe G produite par les vecteurs AAV. De plus, cette protéine est bien fonctionnelle *in vitro* car elle induit la fusion des cellules en présence de protéines F. L'administration de ces vecteurs a ensuite pu être réalisée *in vivo* sur un modèle murin.

1.2 DÉVELOPPEMENT D'UN TEST ELISA POUR LA DÉTECTION DES IG ANTI-NiV G

Jusqu'à récemment, les seules techniques disponibles au laboratoire et permettant de détecter des anticorps spécifiques du virus Nipah devaient être réalisées au sein du laboratoire P4 avec le virus sauvage. De plus, ces tests utilisaient un lysat de cellules infectées par le NiV et ne permettaient donc pas de vérifier si les anticorps produits étaient spécifiques d'une protéine virale donnée. Les manipulations au sein du laboratoire P4 étant lourdes et coûteuses, il est apparu essentiel de développer un test ELISA spécifique de la protéine G dans un environnement de type P2.

Pour développer ce test, nous nous sommes inspirés d'articles plus récents décrivant la production d'une protéine G soluble et son utilisation dans des tests de type ELISA (Bossart *et al.*, 2005a; Eshaghi *et al.*, 2004).

1.2.1 Obtention d'une protéine NiV G soluble

1.2.1.1 Construction d'un plasmide codant la protéine G soluble

La glycoprotéine d'enveloppe G est une protéine membranaire composée de trois domaines : cytoplasmique, transmembranaire et extracellulaire. Pour obtenir une protéine sécrétée sous une forme soluble, les domaines cytoplasmique et transmembranaire ont été remplacés par un peptide signal provenant du virus de la Leucémie Murine (MLV). Le peptide signal est essentiel pour pouvoir obtenir une protéine sécrétée dans le milieu extracellulaire (Figure 32). De plus, lors de la maturation de la protéine G soluble, une protéase cellulaire coupe le peptide signal de la protéine permettant un bon adressage de la protéine vers les systèmes de sécrétions cellulaires. Afin de faciliter la détection de la protéine G soluble et sa fixation sur des supports synthétiques, la séquence codante de la protéine G a aussi été fusionnée avec 6 étiquettes Histidine successives précédées du signal RGS (Arginine-Glycine-Sérine) noté RGS-6xHis.

La protéine G soluble (Gs) développée ici est relativement proche de la protéine Gs mise au point par l'équipe de Bossart *et al.* en 2005 (Bossart *et al.*, 2005a). Les seules différences sont le type d'étiquette utilisé et l'absence de séquences de jonction entre chaque élément. Les domaines extracellulaires sont quant à eux identiques. En ce qui concerne le système de production que nous avons mis en place, une simple transfection de cellules suffit pour obtenir une protéine Gs (voir partie suivante). En comparaison, la construction développée par l'équipe de Bossart *et al.* a été sous-clonée dans un vecteur recombinant dérivé du virus de la Vaccine afin de produire des particules virales. Ces dernières ont ensuite été utilisées pour infecter des cellules et produire la protéine Gs.

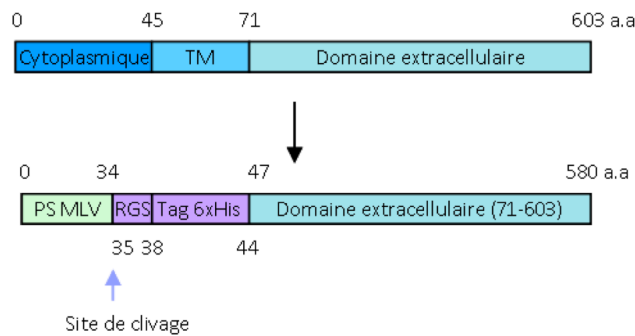


Figure 32. Structure de la protéine NiV.G sauvage et de la forme soluble

Les domaines cytoplasmique et transmembranaire de la protéine G sauvage ont été remplacés par un peptide signal (PS MLV) et une étiquette histidine (RGS-6xHis). Le domaine extracellulaire reste inchangé. Un site de clivage présent à la fin du peptide signal permet un adressage de la protéine au système de sécrétion cellulaire.

1.2.1.2 Production de la protéine G soluble

La sécrétion de cette protéine a été évaluée par transfection transitoire du plasmide phCMV-NiV.G modifié pour exprimer la protéine soluble (phCMV-NiV.Gs). En utilisant un anticorps ciblant les séquences RGS-4xHis, la protéine Gs a pu être détectée par Western blot (WB) dans le surnageant de cellules 293SZ et HeLa 48 h après transfection (Figure 33).

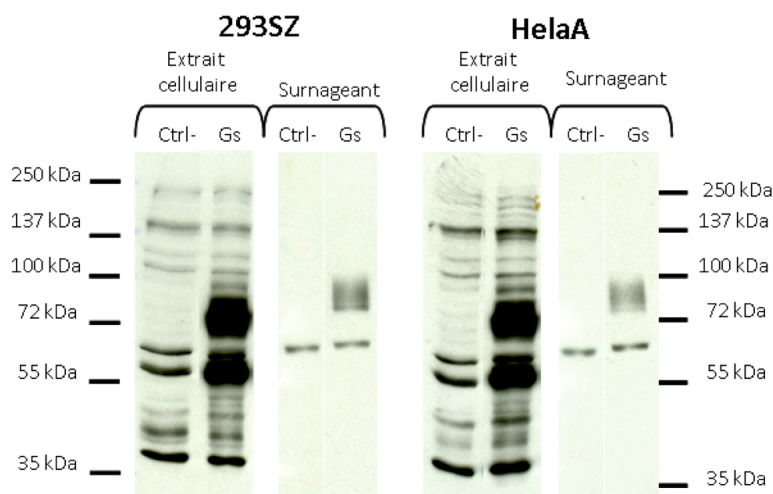


Figure 33. Production de la protéine G soluble

Des cellules 293SZ ou HeLa ont été transfectées par le plasmide phCMV-NiV.Gs. Le contrôle négatif (Ctrl-) est constitué par des cellules non transfectées. La protéine Gs, d'une taille de 75 kDa, est détectée dans les extraits cellulaires et dans le surnageant des cellules 48 h après transfection par WB avec un anticorps anti-RGS-4xHis.

La protéine Gs est sécrétée dans le milieu extracellulaire en quantité légèrement plus importante pour les cellules 293SZ que pour les cellules HeLa. Cette protéine présente une taille d'environ 75 à 80 kDa correspondant à la taille attendue avec toutes les modifications post-traductionnelles notamment les glycosylations, expliquant l'aspect flou de la bande observée. En effet, la protéine Gs sans modification et sans peptide signal possède une taille de 60 kDa. De plus, comme expliqué précédemment, la protéine G possède 5 sites de glycosylations entre les a.a 306 et 529 du domaine extracellulaire et chaque N-glycosylation augmente la taille de la protéine de 2 à 4 kDa.

Dans les extraits cellulaires, deux bandes spécifiques d'environ 75 kDa et 55 kDa ont pu être révélées. La bande d'environ 55 kDa pourrait correspondre à une protéine ancrée à la membrane du réticulum endoplasmique qui n'aurait pas encore subi toutes les modifications post-traductionnelles. La bande de 75 kDa semble correspondre à la protéine Gs prête à être sécrétée ou en cours d'acheminement vers la membrane cellulaire.

Ces résultats montrent que la protéine Gs est effectivement sécrétée par des cellules transfectées transitoirement. Cependant on remarque que la majorité de la protéine reste intra-cellulaire. Cela pourrait être dû soit à une mauvaise efficacité de sécrétion soit à un recaptage de la protéine via le récepteur EphrinB2 présent sur ces cellules. Les cellules 293SZ ont été sélectionnées pour la suite des expériences.

Pour éviter d'effectuer de nombreuses transfections transitoires et dans le but d'obtenir un lot unique de surnageant cellulaire contenant la protéine Gs, les conditions de production ont été améliorées. Dans un premier temps, nous avons cherché à établir une lignée cellulaire exprimant la protéine Gs de façon stable. Pour cela, des cellules 293SZ ont été transfectées avec le plasmide pHCMV-NiV.Gs possédant le gène de résistance à la néomycine puis ont été mises sous sélection à la néomycine (G418) pendant un mois. Comme le montre la Figure 34A, la protéine est toujours présente dans les extraits cellulaires dérivés de la population de cellules 293SZ résistantes à la néomycine. Cependant, contrairement aux cellules transfectées de façon transitoire, la protéine n'a pas pu être détectée dans le surnageant des cellules transfectées de façon stable.

En conclusion, l'expression de la protéine Gs dans le surnageant n'est pas stable sur le long terme. Ceci est probablement dû à l'induction d'une toxicité cellulaire (captage continu de la protéine G par le récepteur EphrinB2) ou l'inhibition de la sécrétion par un système de défense cellulaire. De plus, pendant l'entretien des cellules transfectées, le plasmide est dilué et n'est pas conservé (donnée non montrée ici).

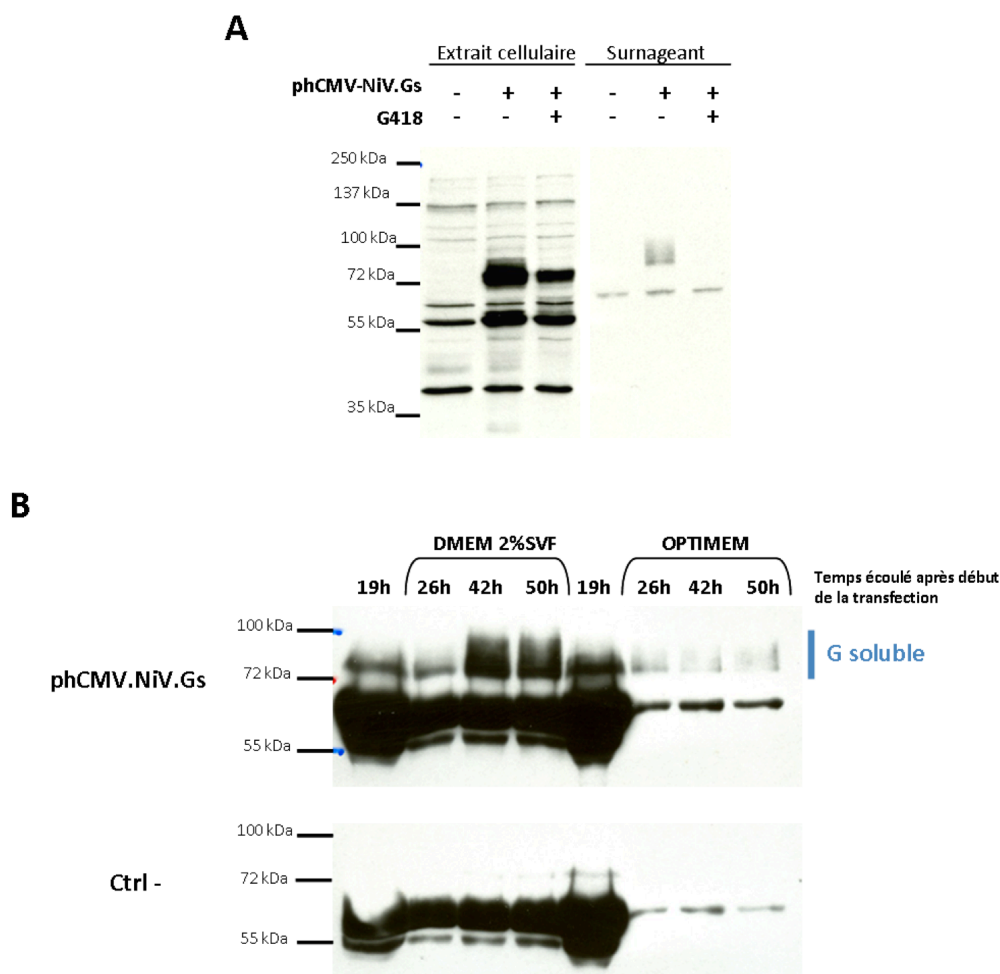


Figure 34. Optimisation de la production de G soluble

A. Lignée stable de cellules 293SZ exprimant la protéine NiV Gs. Après transfection par le plasmide phCMV-NiV.Gs, les cellules ont été sélectionnées par la néomycine (G418) et ensuite analysées par WB en utilisant l'anticorps RGS-4xHis. **B.** Optimisation de la production de la protéine Gs au cours du temps. Les cellules 293SZ ont été transfectées par le plasmide phCMV-NiV.Gs puis cultivées en milieu DMEM ou OPTIMEM. Les surnageants récoltés au cours du temps ont été analysés par WB utilisant l'anticorps anti-RGS-4xHis. Le contrôle négatif (Ctrl-) est constitué de cellules non transfectées cultivées dans les mêmes conditions.

Dans un deuxième temps, afin d'augmenter la quantité de protéine G soluble produite dans le surnageant, deux milieux de culture ont été comparés, l'Opti-MEM, utilisé lors des premiers essais (Figure 33) et le DMEM. Le milieu Opti-MEM est un milieu pauvre en sérum de veau fœtal (SVF) et est généralement utilisé lors de la production de protéines sécrétées dans le milieu extracellulaire. En effet, ce milieu entraîne un ralentissement de la division cellulaire au profit de la production des protéines cellulaires. Le milieu DMEM est un milieu utilisé classiquement en culture cellulaire. Afin de se placer dans des conditions similaires de culture cellulaire, le DMEM n'a été supplémenté que par 2 % de SVF. La quantité de protéine Gs produite a été comparée au cours du temps après transfection transitoire du plasmide phCMV-NiV.Gs (Figure 34B). 19h après transfection, le milieu de culture habituel (DMEM,

10 % SVF) est remplacé par le milieu DMEM supplémenté par 2 % de SVF ou le milieu Opti-MEM. Après transfection, les protéines contenues dans le surnageant cellulaire ont été analysées par WB en utilisant l'anticorps anti-RGS-4xHis. 19 h après transfection, la protéine Gs est détectée dans le surnageant des cellules transfectées (Figure 34B). La production la plus importante est observée 42 h après transfection en présence de DMEM-2 % SVF.

1.2.1.3 Purification et concentration de la protéine G soluble

Afin d'obtenir une protéine Gs concentrée et purifiée pour réaliser des expériences *in vitro* et *in vivo*, deux techniques ont été utilisées.

La première technique utilise le complexe Nickel-acide nitrilotriacétique ou Ni-NTA (*Nickel Nitrilo-triacetic Acid*) permettant la fixation des protéines possédant une étiquette Histidine avec l'appareil Biosprint 15 (Qiagen). Des billes magnétiques recouvertes de la technologie Ni-NTA permettent de purifier et de concentrer les protéines en une seule utilisation. La protéine Gs a pu être purifiée mais que très légèrement concentrée (Figure 35 A et B).

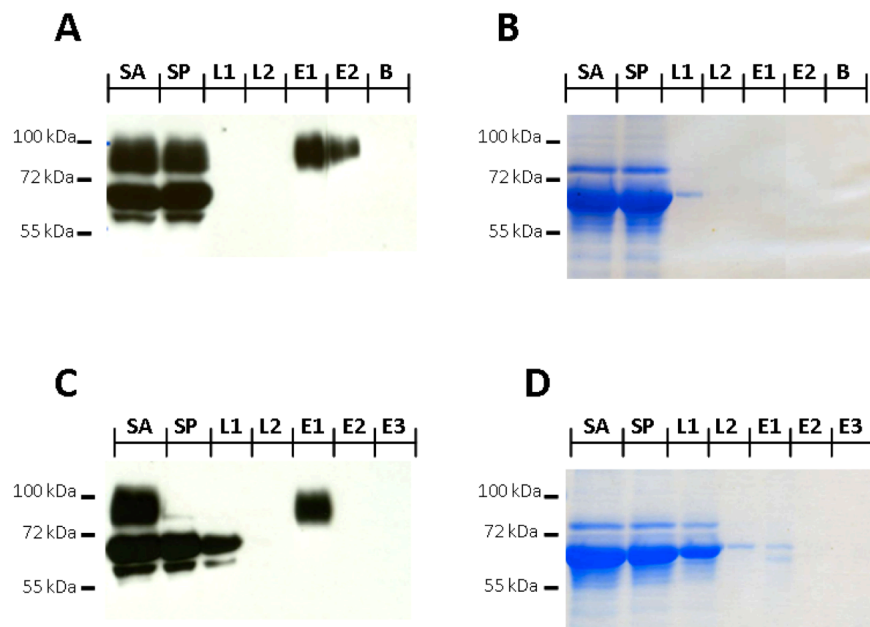


Figure 35. Purification de la protéine G soluble

Purification de la protéine Gs par la technique utilisant des billes magnétiques Ni-NTA (A et B) ou par des colonnes d'affinité Ni-IDA (C et D). Visualisation de la protéine Gs par WB utilisant un anticorps anti-RGS-4xHis (A et C) et visualisation des protéines totales par coloration au bleu de Coomassie (B et D). SA: Surnageant avant utilisation, SP: Surnageant après utilisation, L1: lavage N°1, L2: lavage N°2, E1: Elution N°1, E2: Elution N°2, E3: Elution N°3, B: billes

En effet, nous pouvons remarquer que les billes sont capables de fixer la protéine Gs mais pas dans sa totalité car après passage du surnageant sur les billes, la protéine Gs est encore détectée en grande quantité (Figure 35A, pistes SA et SP). Deux éluions successives sont nécessaires pour décrocher la protéine Gs fixée sur les billes, comme le montre l'absence de protéine Gs sur les billes après élution (Figure 35A, pistes E1, E2 et B). La coloration au bleu de Coomassie indique que les lavages ont permis d'éliminer les protéines contaminantes et donc de purifier le surnageant (Figure 35B, pistes L1, L2, E1 et E2).

Cette technique a permis de concentrer environ 30 fois la protéine Gs. Cependant la quantité de Gs purifiée n'est pas suffisante pour être détectée après coloration au bleu de Coomassie (Figure 35B). En conclusion, cette technique ne semble pas suffisamment appropriée pour purifier et concentrer la protéine Gs.

La deuxième technique que nous avons testé utilise une colonne de fixation au nickel PROTINO® (Macherey Nagel) avec le complexe Nickel-acide Iminodiacétique ou Ni-IDA (*Nickel-Iminodiacetic acid*) ou le complexe Nickel-Éthylène diamine triscarboxyméthyle ou Ni-TED (*Nickel-Triscarboxymethyl ethylene diamine*). La technologie PROTINO® Ni-IDA possède une haute affinité pour les protéines histidines avec 3 sites de liaison par molécule, par contre, la technologie PROTINO® Ni-TED possède une plus haute spécificité pour les protéines avec un seul site de fixation par molécule Ni-TED. Après comparaison entre ces deux technologies, les colonnes Ni-IDA ont permis une fixation beaucoup plus efficace de la protéine Gs (résultats non montrés ici). En effet, toutes les protéines Gs contenues dans le surnageant de culture ont été fixées par la colonne (Figure 35C, pistes SA et SP). Les lavages ont permis l'élimination des protéines non spécifiques comme celles contenues dans le SVF (Figure 35D, pistes SP, L1 et L2). Une seule élution a suffi pour récupérer toute la protéine Gs accrochée à la colonne mais n'a pas permis de la concentrer. Ceci est confirmé par l'absence de détection de la protéine Gs par la coloration au bleu de Coomassie (Figure 35C).

En conclusion, les colonnes PROTINO® Ni-IDA semblent plus adaptées que les billes de nickel pour fixer et purifier la protéine Gs contenue dans le surnageant des cellules transfectées. Cependant quelle que soit la technique utilisée, aucune bande de protéine Gs n'est visible après coloration au bleu de Coomassie, ce qui indique que peu de protéines sont produites dans ce surnageant, à savoir, moins de 10 ng de protéines par μ l de surnageant (limite de détection 50-100 ng pour 10 à 15 μ l de protéines déposées pour l'élution). Une purification par chromatographie d'affinité en phase liquide (FPLC) sur colonne Ni-IDA pourrait permettre d'obtenir une protéine Gs plus concentrée et l'optimisation de la production de Gs pourrait être davantage améliorée.

1.2.1.4 Caractérisation de la protéine G soluble

La protéine G sauvage, ancrée à l'enveloppe virale, est une protéine oligomérique pouvant former des dimères et des tétramères (Bossart *et al.*, 2005a). Le groupe de K. Bossart a développé une protéine NiV Gs possédant exactement le même domaine extracellulaire que la protéine Gs développée ici. Dans leur publication, cette équipe a montré par WB en conditions non dénaturantes, que cette protéine soluble était présente sous une forme dimérique et tétramérique dans les surnageants de culture. Dans notre étude, la capacité d'oligomérisation de la protéine Gs développée pour ce projet a été vérifiée par un WB réalisé en conditions non dénaturantes en utilisant l'anticorps spécifique de la protéine Gs. Nous avons observé, en plus d'une bande de 75 kDa correspondant à la forme monomérique, une bande supérieure à 250 kDa qui suggère la présence d'une forme tétramérique. En revanche, aucune bande correspondant à un dimère n'a été observée (résultat non montré ici). Une amélioration de cette technique aurait peut être permis d'observer la présence de la forme dimérique.

Afin de vérifier la capacité de la protéine Gs à lier son récepteur cellulaire EphrinB2, une expérience de fixation *in vitro* a été réalisée. Des cellules HeLa possédant le récepteur EphrinB2 ont été mises en contact avec du surnageant contenant la protéine Gs, en présence ou non d'azoture de sodium (NaN_3) pour inhiber l'endocytose cellulaire. Deux températures d'incubation ont été utilisées, à savoir, 4°C ou température ambiante. La protéine de fusion S du virus responsable du Syndrome Respiratoire Aigu Sévère (SRAS) est capable de se fixer à de nombreux récepteurs cellulaires. Le domaine de liaison au récepteur cellulaire (RBD) de cette protéine a été modifié et fusionné à une étiquette RGS-6xHistidine. Ce domaine RBD-RGS-6xHistidine a été utilisé comme contrôle positif (fourni par D.Lavilette). Un anticorps dirigé contre cette étiquette et un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa488 ont été utilisés. Le pourcentage de cellules positives a été évalué par cytométrie en flux (Tableau 6).

Aucun marquage n'a été observé pour la protéine RBD qui ne s'est pas fixée sur les cellules HeLa. Une amélioration des conditions expérimentales aurait probablement permis d'obtenir de meilleurs résultats (lignée cellulaire, température, concentration des protéines, quantité d'Azide...). En revanche, une fixation faible mais détectable de la protéine Gs est observée de façon indépendante du facteur d'inhibition de l'endocytose et des conditions de température. Ce résultat préliminaire suggère que la protéine Gs est capable de se fixer au récepteur cellulaire. Cependant d'autres expériences auraient du être réalisées pour confirmer ce résultat.

	T° ambiante	4°C
Ctrl -	0	0
RBD	0,3	0
Gs	6,1	3,1
Ctrl - + NaN₃	0	0
RBD + NaN₃	0	0
Gs + NaN₃	4	3,4

Tableau 6. Fixation de la protéine Gs à son récepteur cellulaire EphrinB2

Des cellules HeLa ont été incubées (température ambiante ou 4°C) avec la protéine Gs pour vérifier sa capacité de liaison au récepteur cellulaire EphrinB2 ou le domaine RBD fusionné à une étiquette RGS-Histidine, utilisé comme contrôle positif. Une quantité de 0.2 % d'azoture de sodium (NaN₃) a été utilisée permettant d'inhiber l'endocytose cellulaire. Après fixation des protéines sur les cellules, un anticorps permettant la reconnaissance de 5xHistidine a été utilisé ainsi qu'un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 488. Le pourcentage de cellules positives a été déterminé par cytométrie en flux.

En conclusion de cette partie, nous avons observé que la protéine Gs est correctement sécrétée dans le surnageant de cellules transfectées. L'obtention de clones stables n'ayant pu être réalisé, des transfections transitoires ont dû être réalisées afin d'obtenir des stocks de surnageant contenant la protéine Gs. De plus, cette protéine a pu être purifiée mais pas ou peu concentrée. D'autres expériences seraient nécessaires pour obtenir une protéine Gs concentrée. Des expériences préliminaires ont permis de vérifier quelques caractéristiques physiques de la protéine Gs.

1.2.2 Sélection des sérums servant de contrôle positif pour le test ELISA

Après avoir produit la protéine Gs, nous avons procédé à la mise au point d'un test ELISA en utilisant des anticorps spécifiques de la protéine G, préalablement développés par V. Guillaume et I. Grosjean. Plus précisément, une banque d'hybridomes a été utilisée, produisant des IgG de différents isotypes dirigés contre la protéine NiV G (Guillaume *et al.*, 2006b). Ces hybridomes ne fonctionnent pas en WB mais sont capables de neutraliser plus ou moins efficacement le NiV sauvage dans un test de séroneutralisation réalisé au laboratoire P4. Parmi ceux-ci, les hybridomes ; 5a7.6 (IgG2), 5G11-18 (IgG1) et 7D9-2 (IgG1) ont été sélectionnés comme contrôles positifs monoclonaux (Tableau 7).

Dans quelques cas, nous avons aussi utilisé des ascites dérivés de ces hybridomes. De plus, la mise au point du test ELISA a aussi été réalisée en utilisant un mélange de sérums de souris (sérum polyclonal). Ces sérums ont été obtenus lors d'une expérience pilote après l'injection de vecteurs AAV-NiV.G chez la souris, et ont été sélectionnés pour la présence d'AcN anti-NiV par un test de séroneutralisation réalisé au P4 (données non montrées).

Anticorps anti-NiV.G	Isotype IgG
Nip 1.7	IgG1
Nip 3B10	IgG1
Nip 5a7.6	IgG2a
Nip 2H10	IgG1
Nip 5G11-18	IgG1
Nip 7D9-2	IgG1
Nip 2F3	IgG2b
Nip 16	IgG1
Nip 11	IgG1
Nip 10	IgG1
Nip 9	IgG1
Nip 8	IgG1
Nip 7F3	IgG2b

Tableau 7. Liste des hybridomes de souris anti-NiV G produits par V. Guillaume et I. Grosjean, et disponibles à la cellulothèque de la SFR Biosciences.

En bleu sont représentés les hybridomes sélectionnés.

1.2.3 Validation du test ELISA

Le principe de ce test ELISA repose sur l'utilisation de la protéine Gs fusionnée à l'étiquette histidine et capable de se fixer sur une plaque 96 puits recouverte de complexe Nickel Ni-NTA. Les sérums à tester ainsi que les contrôles positifs sont déposés dans la plaque (voir partie 1.2.2). Un anticorps secondaire couplé à la peroxydase (HRP) spécifique des IgG totaux ou d'un sous-type d'IgG est utilisé pour détecter les anticorps anti-NiV.G. Après ajout du substrat enzymatique, la réaction est stoppée par de l'acide chlorhydrique (HCl). La densité optique (DO) de la plaque ELISA est mesurée à une longueur d'onde de 450 nm (Figure 36A).

Les premiers essais ont été réalisés dans le but de vérifier la capacité de fixation de la protéine Gs au complexe Ni-NTA présent sur les plaques ELISA. En d'autres termes, le repliement et la conformation protéique de la protéine Gs (accessibilité des épitopes) ont été évalués en utilisant les hybridomes monoclonaux et le sérum polyclonal spécifiques de la protéine NiV.G sauvage. Pour cela, la protéine Gs obtenue à partir des surnageants de cellules transfectées a été diluée de façon successive. En parallèle, un surnageant de cellules non transfectées et récolté dans les mêmes conditions a été utilisé comme contrôle négatif. Afin d'éliminer le bruit de fond, la DO obtenue avec la protéine Gs a été soustraite à la valeur de DO obtenue pour le contrôle négatif. Les résultats de l'ELISA ont été exprimés en ΔDO_{450nm} .

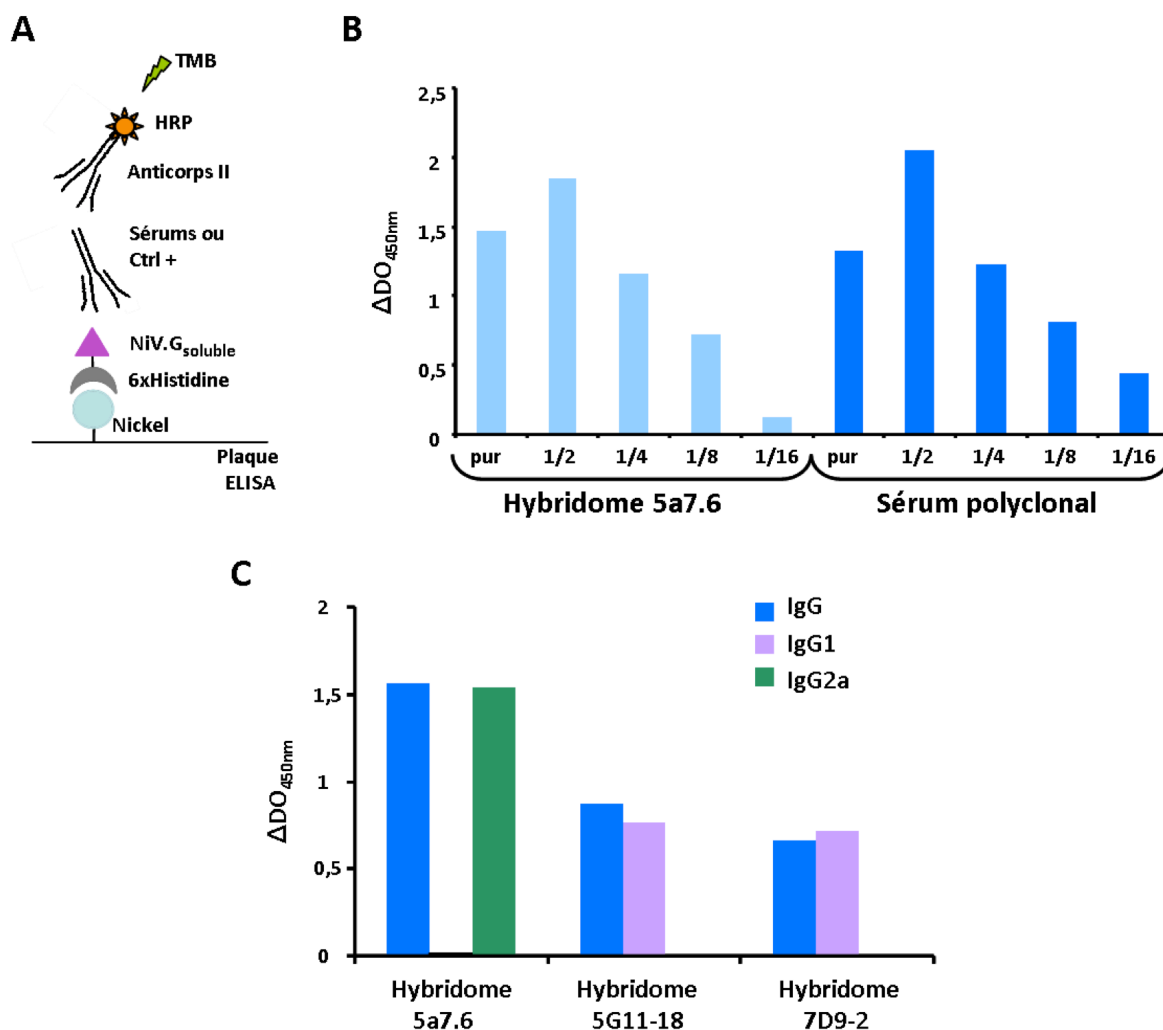


Figure 36. Mise au point du test ELISA

A. Schéma explicatif du test ELISA utilisant la protéine G soluble. Des plaques sont incubées sur la nuit à 4°C avec le surnageant de cellules contenant ou non la protéine Gs. Les sérums ou les anticorps contrôles sont dilués et déposés dans la plaque puis un anticorps secondaire couplé à la peroxydase est ajouté. La révélation de ce test s'effectue par l'ajout du substrat de la peroxydase. **B. Détection de la protéine Gs par les contrôles positifs.** Les surnageants des cellules contenant ou non la protéine Gs sont dilués successivement puis incubés sur les plaques ELISA sur la nuit à 4°C. L'hybridome 5a7.6 est dilué à 25 ng/puits et le sérum polyclonal est dilué au 1/750^{ème}. Ces anticorps sont incubés pendant 2 h à température ambiante puis l'anticorps secondaire couplé HRP dirigé contre les IgG totales dilué au 1/10 000^{ème} est ajouté. La DO est mesurée à 450 nm. **C. Détection des sous-types d'IgG spécifiques de la protéine G.** Le surnageant cellulaire dilué au 1/2 est déposé sur la plaque ELISA et incubé sur la nuit à 4°C. Les hybridomes dilués à 400 ng/puits sont incubés sur la plaque ELISA pendant 2 h à température ambiante. Les anticorps secondaires anti-IgG1 ou anti-IgG2a de souris dilués au 1/10 000^{ème} sont ajoutés. La DO est mesurée à 450 nm.

Lors d'un premier essai, la protéine Gs a été détectée par l'anticorps monoclonal 5a7.6 ainsi que par le lot d'anticorps polyclonaux de souris (Figure 36B). Ce premier test a permis de déterminer que l'utilisation du surnageant Gs pur induisait une saturation du signal car en le diluant de moitié, un ΔDO_{450nm} plus important était obtenu. De plus, ce signal semblait

spécifique car la diminution du signal était proportionnelle aux dilutions de protéine Gs réalisées. D'après les résultats obtenus, une dilution du surnageant Gs au 1/2 paraissait optimale.

Le second essai a permis de vérifier les isotypes d'IgG des hybridomes 5a7.6, 5G11-18 et 7D9-2 grâce à des anticorps secondaires reconnaissant les IgG1 et les IgG2a (Figure 36C). Nous avons ainsi confirmé que l'hybridome 5a7.6 était constitué d'IgG2a, alors que les hybridomes 5G11-18 et 7D9-2 étaient composés d'IgG1. Ces résultats ont permis de valider la fonctionnalité du test ELISA pour la détection d'anticorps spécifiques de la protéine Gs.

1.2.4 Indications supplémentaires

D'autres essais de mise au point réalisés par la suite ont permis de montrer que : 1) la décomplémentation ou non des sérums des animaux n'a pas d'influence sur la densité optique mesurée, 2) l'utilisation d'ascite spécifique de la protéine NiV.G augmente considérablement le bruit de fond, c'est pourquoi l'utilisation des hybridomes a été privilégiée.

Pour ce travail de thèse, trois stocks de surnageants contenant la protéine Gs ou non (contrôle négatif) ont été produits. Pour s'assurer de la reproductibilité du test ELISA, chaque lot de surnageant a été caractérisé afin de déterminer la dilution permettant d'obtenir des ΔDO_{450nm} identiques pour les contrôles positifs.

Pour quantifier les IgG totaux anti-NiV.G détectées, il est nécessaire de quantifier la protéine Gs et de posséder un anticorps spécifique de concentration connue. Il n'a pas été possible de quantifier la protéine Gs car aucun anticorps spécifique de cette dernière de concentration connue n'est disponible. De plus, comme montré précédemment, cette protéine n'est pas détectée par la coloration au bleu de coomassie, ce qui indique qu'elle est faiblement exprimée. Le seul test ELISA quantitatif existant permettant la quantification des hybridomes anti-NiV.G repose uniquement sur la détection de la partie constante du fragment de l'IgG et ne se base en aucun cas sur sa spécificité contre l'antigène. Plutôt que de faire de fausses approximations, nous n'avons pas souhaité représenter nos données en quantité d'IgG mais plutôt en densité optique.

1.3 DÉVELOPPEMENT DU TEST DE SÉRONEUTRALISATION

Les anticorps neutralisants (AcN) sont l'un des éléments les plus importants mis en place par le système immunitaire en réponse à un agent pathogène. Dans le cas d'une infection virale, ces anticorps ont la particularité d'être spécifiques d'un virus et de pouvoir

empêcher l'entrée de celui-ci dans la cellule cible, d'où son appellation « neutralisant ». De ce fait, les AcN peuvent empêcher ou diminuer la propagation du virus au sein de l'organisme et permettent de stimuler les réponses immunitaires par la formation de complexes immuns. Afin de mieux caractériser les réponses immunitaires développées lors d'un protocole de vaccination, il est impératif de pouvoir détecter ces AcN afin d'en évaluer la présence et la quantité.

Pour cette étude portant sur l'analyse des réponses humorales dirigées contre la protéine G du virus Nipah, il est essentiel de déterminer la quantité d'AcN spécifiques de cet antigène. Au début de ce projet, le seul test disponible pour détecter ces AcN était réalisé au sein du laboratoire P4 et utilisait le virus Nipah sauvage. Ce test reposait sur la capacité des anticorps à neutraliser l'entrée du virus dans les cellules, empêchant ainsi la réplication de ce dernier et la lyse des cellules.

Afin de s'affranchir des manipulations au sein du laboratoire P4, des pseudoparticules rétrovirales ou VLP portant les glycoprotéines d'enveloppe F et G du virus Nipah ont été développées en collaboration avec Judit Szécsi et François-Loïc Cosset.

1.3.1 Développement des pseudoparticules VLP-NiV

En s'inspirant des VLP pseudotypées par les glycoprotéines d'enveloppe du virus MV (Paramyxovirus) mis au point par C. Frecha en 2008 (Frecha *et al.*, 2008), et des VLP pseudotypées par le virus de la grippe (Szécsi *et al.*, 2009), les deux glycoprotéines F et G du virus Nipah ont été tronquées dans leur partie cytoplasmique. En effet, dans le cas des VLP-MV, il est décrit que l'incorporation simultanée des deux glycoprotéines n'avait pu être observée qu'après avoir tronqué une partie de leur région intra-cytoplasmique. C'est pourquoi la protéine F du virus NiV, qui est une glycoprotéine de type I, a été tronquée de 24 a.a (FΔ24) dans son domaine cytoplasmique en position C-term. La protéine G, glycoprotéine de type II a quant à elle, été tronquée de 20 a.a (GΔ20) dans son domaine cytoplasmique situé en position N-term.

Les VLP-Nipah ont été produites comme expliqué dans la Figure 37. Quatre plasmides ont été transfectés dans des cellules 293T. Le premier plasmide possède les gènes *gag* et *pol* provenant du Rétrovirus MLV, et apporte les éléments nécessaires *en trans* à la formation d'une particule rétrovirale (protéines de structure et enzymes rétrovirales). Le deuxième plasmide porte la cassette d'expression du transgène, le gène *gfp*, avec un promoteur et un site de poly-adénylation, précédé par un signal d'encapsidation (ψ) et entouré de par et d'autre par les longues séquences terminales répétées ou LTR (Long Terminal Repeat) du virus MLV. Enfin, les gènes codant pour les glycoprotéines d'enveloppe de NiV tronquées

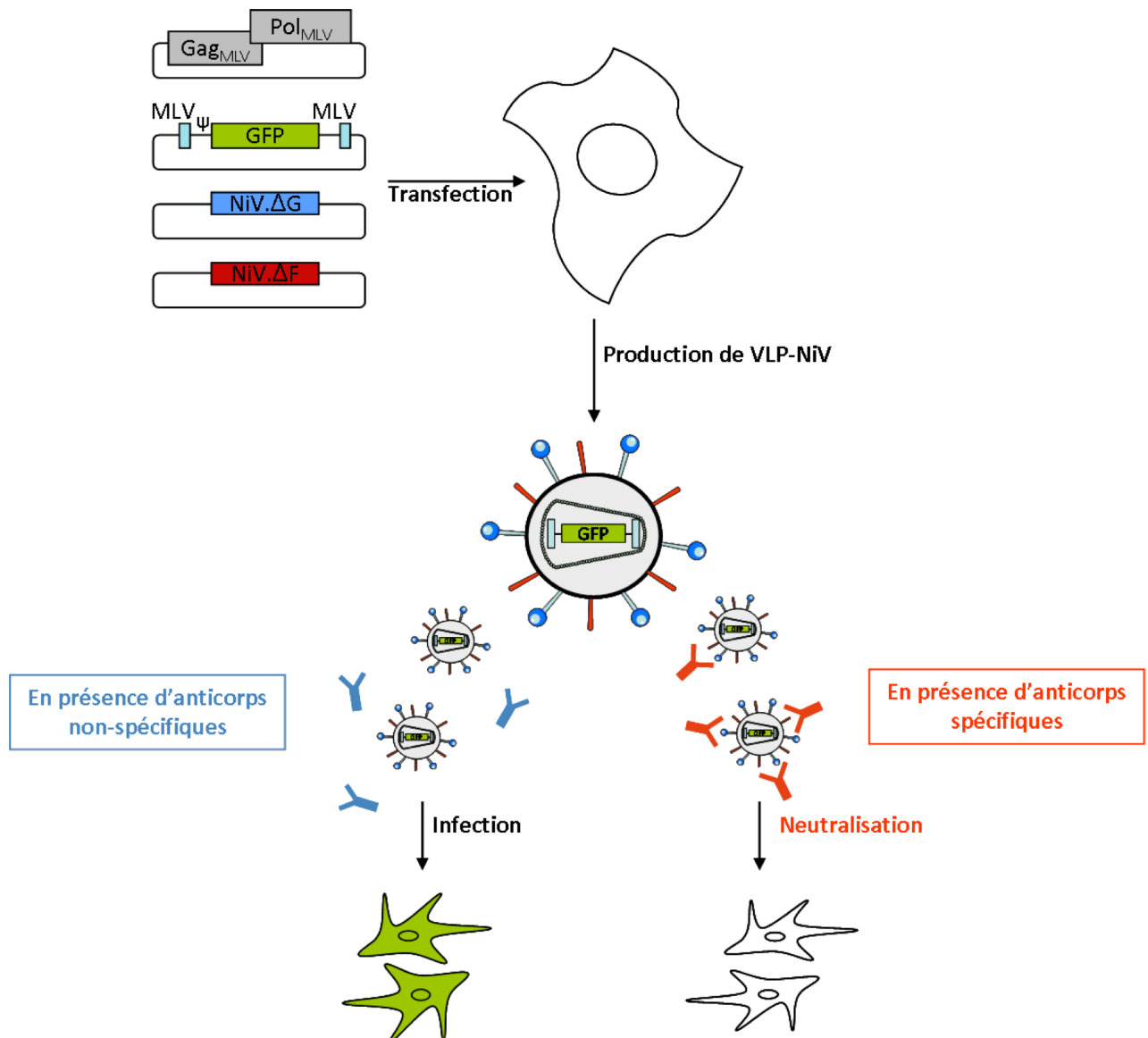


Figure 37. Principe du test de séroneutralisation

Des cellules 293T sont transfectées par quatre plasmides permettant la formation d'une particule rétrovirale de type MLV, codant pour le gène rapporteur *gfp* et portant à leur surface les glycoprotéines FΔ24 et GΔ20 du virus Nipah. Ces particules sont sécrétées dans le surnageant des cellules transfectées par transport vésiculaire. Le surnageant contenant les VLP-NiV est récupéré et utilisé pour le test de séroneutralisation. En présence d'anticorps non spécifiques, les VLP-NiV pourront infecter la cellule cible, en s'intégrant au génome et la protéine GFP sera exprimée. Dans le cas contraire, en présence d'AcN spécifiques de la protéine G des VLP-NiV, les particules seront neutralisées et ne pourront pas infecter la cellule hôte. Il n'y aura donc pas d'expression de la protéine GFP. L'analyse par cytométrie en flux permettra de quantifier les cellules GFP+ et de déterminer le pourcentage d'inhibition de la transduction.

sont apportés par les deux plasmides restants, nécessaires à la formation de particules infectieuses. Les cellules ainsi co-transfectées produisent dans le surnageant des particules VLP-NiV composées d'un core rétroviral et pseudotypées avec les glycoprotéines G et F.

Les VLP-NiV portant à leur surface les glycoprotéines FΔ24 et GΔ20 du virus Nipah ont été utilisées pour développer un test de séroneutralisation en confinement de type P2. Ainsi, en absence d'anticorps ou en présence d'anticorps non spécifiques, les VLP-NiV infecteront les cellules cibles par le récepteur EphrinB2 présent sur ces dernières. La cassette d'expression GFP va s'intégrer au génome de la cellule hôte et la protéine GFP sera exprimée (Figure 37).

Ces VLP-NiV étant dépourvues des éléments nécessaires à leur réplication, aucune nouvelle particule infectieuse ne pourra être produite. En revanche en présence d'AcN spécifiques de la protéine G du virus Nipah, les VLP-NiV seront neutralisées, incapables d'infecter les cellules cibles et aucune protéine GFP ne sera exprimée. Le pourcentage de cellules GFP+ pourra ensuite être déterminé par cytométrie en flux pour déterminer le pourcentage d'inhibition de transduction en présence de diverses sources d'anticorps.

Afin de mesurer la fixation non spécifique des anticorps à la surface des VLP, un contrôle négatif a été utilisé. Ce contrôle est constitué de VLP pseudotypées MLV portant à leur surface la glycoprotéine G du virus du VSV (VLP-VSVG).

Pour développer ce test de séroneutralisation, des cellules cibles ont dû être sélectionnées pour leur capacité à être infectées par les deux types de VLP. Trois lignées cellulaires ont été comparées : les TE, et deux sources de cellules HeLa, les HeLa N°1 et les HeLa N°2.

Ces lignées ont été infectées par différentes dilutions de VLP-NiV ou VLP-VSVG (Figure 38). Les VLP-VSVG infectent les 3 lignées cellulaires. En revanche, seules les cellules HeLa N°2 sont infectées de façon efficace par les VLP-NiV et ont permis d'obtenir au moins 10 % de cellules infectées avec une dilution du surnageant au ½ ou au ¼. Les cellules HeLa N°2 ont donc été choisies comme cible cellulaire pour ce test de séroneutralisation. Une titration des particules infectieuses a été réalisée sur ces cellules avec $8,11.10^6$ ou $5,77.10^5$ pi/mL (particules infectieuses) respectivement pour les VLP-VSVG et VLP-NiV.

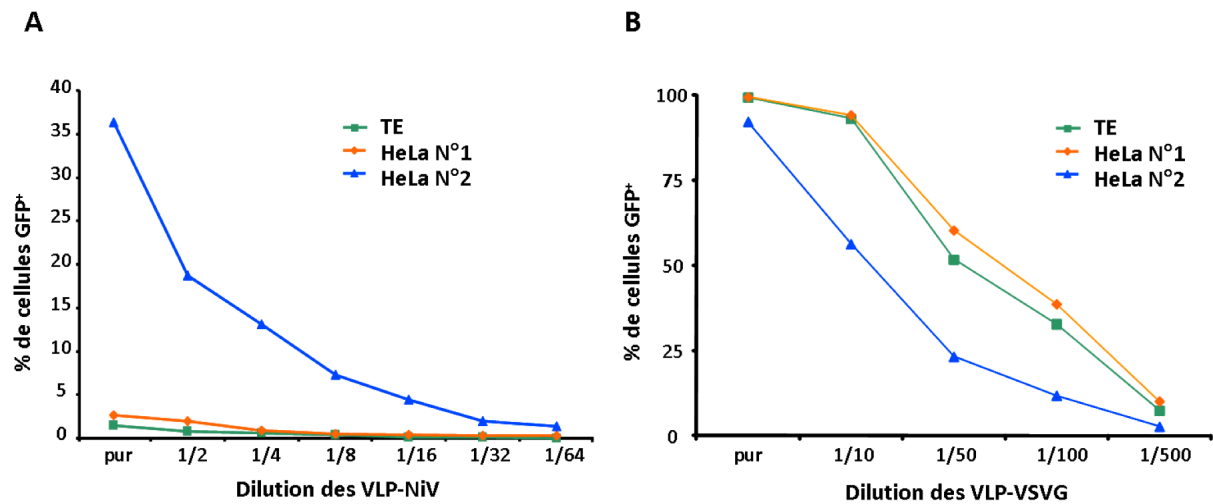


Figure 38. Choix de la lignée cellulaire pour le test de séroneutralisation

Les cellules TE, HeLa N°1 ou HeLa N°2 ont été mises en contact avec du surnageant cellulaire contenant des VLP-NiV (A) ou des VLP-VSVG (B). Des dilutions de ce surnageant ont été effectuées et le pourcentage de cellules GFP+ (impliquant une infection des cellules par les VLP) a été mesuré par une analyse de cytométrie en flux.

1.3.2 Mise au point du test de séroneutralisation

Pour mettre en place le test de séroneutralisation, les hybridomes et le sérum murin polyclonal ont été évalués pour leur capacité à neutraliser les particules VLP-NiV *in vitro*. Les particules virales pseudotypées par les protéines G des virus NiV ou VSV ont été préalablement incubées avec l'hybridome 5a7.6 ou le sérum polyclonal. Ces mélanges ont ensuite été ajoutés et incubés avec les cellules HeLa. Le pourcentage d'inhibition a été déterminé en comparant le pourcentage de cellules GFP+ obtenu avec le contrôle VLP sans sérum avec le pourcentage de cellules GFP+ obtenu en présence d'anticorps.

Comme le montre la Figure 39A, l'hybridome comme le sérum polyclonal est capables d'inhiber 90 à 95 % des particules VLP-NiV mais pas l'entrée des particules VLP-VSVG dans les cellules, ce qui démontre la spécificité du test. Pour ce test de séroneutralisation, un signal d'inhibition inférieur ou égal à 20 % est considéré comme non spécifique. Ces anticorps spécifiques de la protéine G sont donc capables de neutraliser les VLP-NiV, ce qui valide la fonctionnalité de ce test.

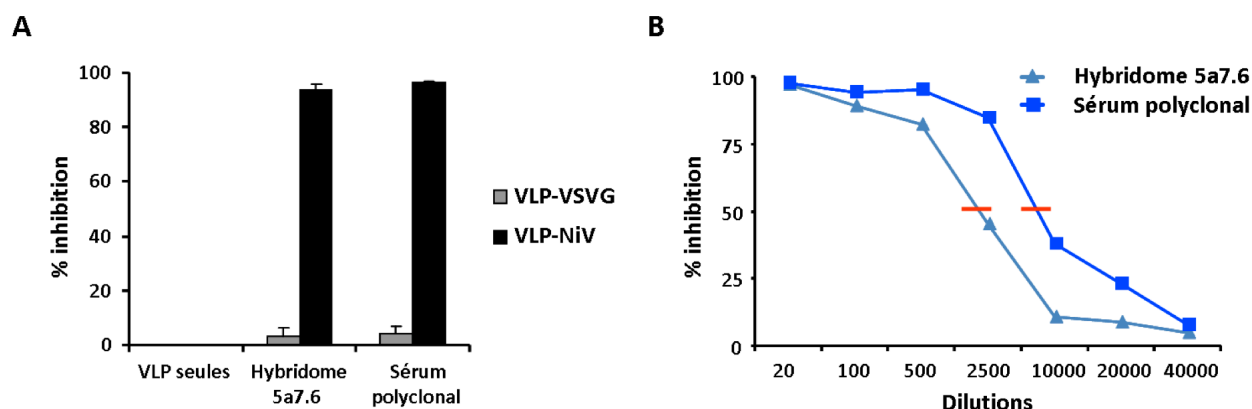


Figure 39. Mise au point du test de séroneutralisation

A. Neutralisation des VLP-NiV par les anticorps contrôles. Les particules VLP (diluées au 1/4 et au 1/100 pour les VLP-NiV et VLP-VSVG) ont été mises en contact avec l'hybridome 5a7.6 ou le sérum polyclonal dilué au 1/100 puis incubées avec les cellules HeLa. Le pourcentage d'inhibition des AcN est représenté pour VLP-NiV (noir) et VLP-VSVG (gris). Un signal inférieur ou égal à 20 % d'inhibition est considéré comme un signal négatif. **B. Détermination du titre en AcN des contrôles.** Le titre en AcN est déterminé en diluant successivement les anticorps en présence d'une quantité fixe de VLP. Après mesure du pourcentage de cellules GFP+, la dilution limite est déterminée. La $CI_{50\%}$ des AcN contrôles correspond à la dernière dilution de sérum permettant l'obtention d'au moins 50 % d'inhibition du signal initial. Le 50 % d'inhibition est représenté par le trait rouge. Ainsi, la $CI_{50\%}$ de l'hybridome est égal à 500 et pour le sérum polyclonal à 2500.

Ce test de séroneutralisation permet également de titrer les AcN présents dans le sérum. Il s'agit de réaliser des dilutions successives du sérum jusqu'à atteindre un pourcentage d'inhibition des VLP fixé par l'expérimentateur. Pour ce travail de thèse, les résultats ont été exprimés en $CI_{50\%}$ (Concentration Inhibitrice à 50 %) représentant la dernière dilution de sérum permettant d'inhiber 50 % du signal initial. Ainsi pour l'hybridome 5a7.6 et le sérum polyclonal, des dilutions successives ont été réalisées en présence d'un nombre fixe de particules VLP-NiV (Figure 39B). Plus l'anticorps est dilué et plus le potentiel d'inhibition diminue. Le titre en AcN déterminé par la $CI_{50\%}$ est de 500 et de 2500 respectivement pour l'hybridome 5a7.6 et le sérum polyclonal.

Ce test de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV a donc permis de détecter l'apparition des AcN spécifiques de la protéine G du virus Nipah au cours du temps et de les titrer.

1.3.3 Corrélation entre les deux tests de séroneutralisation

Afin de valider ce nouveau test de séroneutralisation *in vitro*, ce test a été comparé avec le test de neutralisation utilisant le virus sauvage réalisé au laboratoire P4. Au cours de cette thèse, deux modèles d'animaux ont été immunisés contre la protéine G du virus Nipah,

des souris et des hamsters. Certains sérums de ces animaux ont été analysés par les deux techniques de séroneutralisation présentées et les résultats obtenus ont été comparés (Figure 40).

La difficulté rencontrée a été de comparer les résultats obtenus entre eux. Plus précisément, le test de séroneutralisation utilisant le virus NiV sauvage définit la dernière dilution de sérums qui permet l'obtention d'un tapis cellulaire intact, soit 100 % d'inhibition du virus NiV sauvage. A la dilution suivante de sérum, toutes les cellules sont détruites par l'infection virale, soit 0 % d'inhibition. Ainsi, seulement le 100 % ou le 0 % d'inhibition peuvent être déterminés par cette technique. En revanche, pour le nouveau test de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV, le 100 % d'inhibition est rarement atteint et bien souvent, seuls 90 % d'inhibition sont observés. L'absence d'inhibition n'est jamais obtenue compte tenu du bruit de fond inhérent à ce test. Ainsi, avec les VLP-NiV, seule une $CI_{90\%}$, une $CI_{50\%}$ ou encore une $CI_{20\%}$ peuvent être définies. Il n'a donc pas été possible de comparer les CI de ces deux tests. Néanmoins, nous avons choisi de comparer un 100 % d'inhibition pour le test réalisé au sein du laboratoire P4 utilisant le virus NiV sauvage et un 50 % d'inhibition pour le test VLP-NiV réalisé en laboratoire P2 (Figure 40).

Concernant les titres moyens en AcN obtenus avec les sérums de souris ou de hamsters, le test VLP-NiV a permis l'obtention de titres plus élevés qu'avec le test NiV sauvage réalisé au P4. Cette différence est plus marquée pour les sérums de hamsters que les sérums de souris (Figure 40A et B). Le coefficient de détermination (R^2) ou le coefficient de corrélation linéaire (R) ont permis de définir si les résultats de ces deux tests étaient similaires. En effet, lorsque la valeur du R^2 est proche de 1 et la valeur du R proche de 1 ou -1 cela signifie que les deux tests comparés sont corrélés.

En analysant les valeurs des R^2 pour les deux types d'animaux utilisés, des valeurs de 0,6754 ($R=0,822$) et de 0,8367 ($R=0,915$) sont obtenues pour les sérums de souris et de hamster, respectivement. Plus les valeurs des R^2 (comme les valeurs des R) obtenues sont proches de 1 plus la corrélation entre les tests est forte. Ces résultats indiquent donc que les deux techniques utilisées sont comparables entre elles bien que le test VLP-NiV fournisse des valeurs absolues plus importantes.

En conclusion, ces résultats indiquent que le test de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV permet bien de s'affranchir du test utilisant le virus NiV sauvage réalisé au sein du laboratoire P4. Ce test permet de détecter et de quantifier de façon efficace les AcN spécifiques de la protéine G.

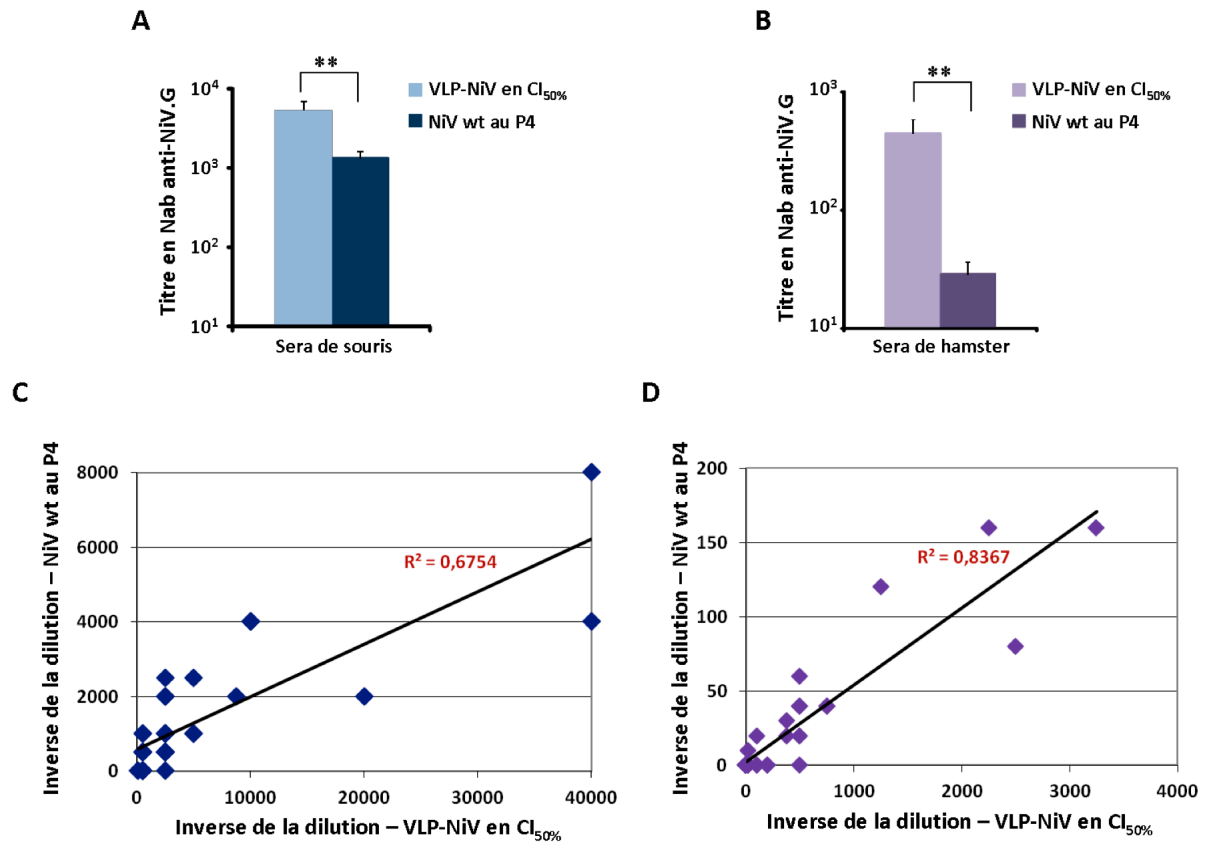


Figure 40. Régression linéaire entre les tests de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV ou le virus NiV sauvage

Titration d'anticorps neutralisants anti-NiV.G présents dans les sérums de souris (**A** et **C**) et de hamsters (**B** et **D**) immunisés par la protéine NiV.G. 34 sérums de souris immunisées et 33 de hamsters ont été analysés puis comparés par les deux techniques de séroneutralisation. La moyenne des titres en AcN obtenus par les deux techniques est représentée pour la souris (**A**) et pour le hamster (**B**). Une régression linéaire a été effectuée pour les sérums de souris (**C**) et de hamsters (**D**) avec en abscisse l'inverse de la dernière dilution de sérums permettant l'obtention d'un $CI_{50\%}$ avec les VLP-NiV et en ordonnée l'inverse de la dernière dilution permettant l'obtention d'un tapis cellulaire intact avec le virus NiV sauvage au P4. Un coefficient de détermination (R^2) entre 0,5 et 1 signifie que les deux tests sont corrélés. ** statistiquement significatif avec $p < 0.01$.

2. INJECTION DE VECTEURS AAV-NiV.G CHEZ DEUX MODÈLES ANIMAUX

2.1 RÉSUMÉ DE L'ARTICLE A.PLOQUIN *ET AL.*

Dans la première partie de ces résultats, les vecteurs AAV-NiV.G de différents sérotypes ont été produits. De plus, deux techniques permettant la détection d'anticorps spécifiques de la protéine G ont été développées et validées. Cette deuxième partie porte sur l'utilisation de ces vecteurs *in vivo* et le développement des réponses humorales dirigées contre la protéine G du virus Nipah.

2.1.1 Injection des vecteurs AAV-NiV.G chez le modèle murin

2.1.1.1 Suivi et caractérisation des réponses humorales chez la souris

L'objectif de cette première expérience a été de déterminer la voie d'injection la plus efficace, ainsi que le sérotype, permettant l'induction des réponses anticorps les plus fortes et les plus rapides dirigées contre la protéine G. Pour cela, différents sérotypes de vecteurs AAV-NiV.G ont été administrés par deux voies différentes chez des souris. En effet, bien que la souris ne soit pas un modèle animal adapté pour l'étude du NiV, ce modèle animal nous permettait de comparer plusieurs conditions d'immunisation dans des conditions plus faciles et abordables qu'avec d'autres modèles animaux plus gros. La voie IM est une voie d'administration principalement utilisée pour la vaccination humaine de par sa facilité d'exécution et son efficacité. Les monocytes sont les premières cellules immunitaires à être présentes dans le tissu musculaire et à rencontrer l'antigène (Marino *et al.*, 2011). La voie ID est un site d'injection intéressant car le derme comprend de nombreuses cellules du système immunitaire comme les cellules de Langerhans (cellules présentatrices d'antigènes), des lymphocytes et des macrophages (Lambert and Laurent, 2008; Nestle *et al.*, 2009). Ces cellules immunitaires jouent un rôle important dans la prise en charge de l'antigène et dans le type de réponses immunitaires mis en jeu. Pour cette expérience, trois sérotypes d'AAV ont été sélectionnés (voir Résultats, Chapitre 1.1.2), le sérotype 1 qui transduit efficacement les fibres musculaires, le sérotype 8 qui possède un large tropisme et le sérotype hybride rh32.33 qui est un sérotype chimérique décrit pour induire des réponses immunitaires fortes (Gao *et al.*, 2002b; Lin *et al.*, 2009; Mays *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 1999a).

Les vecteurs AAV1-NiV.G, AAV8-NiV.G et AAVrh32.33-NiV.G ont été injectés par voie IM ou ID chez des souris Balb/c. L'apparition des réponses humorales dirigées contre la protéine NiV G a été suivie au cours du temps. Une réponse IgG spécifique est apparue après

4 à 6 semaines d'immunisation et la majorité des réponses a atteint un plateau trois mois après l'injection des vecteurs (Figure 2A de l'article). Le vecteur AAV8-NiV.G par voie IM induit la réponse IgG la plus forte et la plus rapide.

Afin de mieux caractériser les réponses IgG observées, les isotypes d'IgG spécifiques de la protéine G ont été analysés (Figure 2B de l'article). Tous les sérotypes injectés par voie IM ou ID induisent le développement d'IgG1 et d'IgG2a. En revanche, le vecteur AAV8-NiV.G par la voie IM induit un titre en IgG2a significativement plus important que le titre en IgG1 (facteur 150), mais cette tendance n'a pas été observée pour l'injection par voie ID.

Le développement d'anticorps neutralisants spécifiques de la protéine suit le même schéma d'apparition que les réponses IgG (Figure 2C de l'article). Comme observé précédemment, le vecteur AAV8-NiV.G induit une réponse AcN plus rapide et plus forte que dans les autres conditions observées. Cette tendance est confirmée par un titre en AcN de 4 et 7 fois supérieur comparé aux vecteurs AAVrh32.33 et AAV1 respectivement.

En conclusion de cette première partie, les vecteurs AAV-NiV.G permettent d'induire des réponses humores *in vivo* composées d'IgG et d'AcN spécifiques de la protéine G. Le vecteur AAV8-NiV.G injecté par voie IM est la combinaison la plus efficace et semble induire une orientation de la réponse immunitaire vers une réponse de type Th1 (réponse cellulaire).

Une seconde injection de vecteurs AAV a été réalisée quatre mois après la première immunisation pour augmenter les réponses humores observées (Figure 1 et 3 de l'article). Un sérotype d'AAV alternatif a été administré pour empêcher la neutralisation des particules par des AcN spécifiques de la capsid d'AAV injectée en premier lieu. Les animaux, qui ont reçu en première injection le sérotype 1 ou 8, ont été injectés avec le sérotype rh32.33, et les animaux ayant reçu le sérotype rh32.33 en première injection ont été injectés avec le sérotype 1. Une légère augmentation du titre en IgG totaux et AcN a pu être observée pour toutes les conditions (sérotype + voie d'injection) mais ces différences ne sont pas significatives. En conclusion, les réponses humores n'ont été que légèrement augmentées par une seconde injection de vecteurs AAV-NiV.G.

2.1.1.2 Analyse de la persistance du vecteur AAV et de son expression

Afin de mieux comprendre l'absence de stimulation du système immunitaire induite par la seconde injection du vecteur AAV-NiV.G, la persistance du vecteur AAV a été évaluée au cours du temps. Une nouvelle expérience *in vivo* a été réalisée. Des souris Balb/c ont été immunisées par voie IM avec un vecteur AAV8-NiV.G ou un vecteur contrôle AAV8-GFP. Le muscle injecté a été prélevé à différents temps et la présence de l'ADN et de l'ARN du

vecteur AAV a été évaluée par des analyses en PCR quantitative (Figure 4 de l'article). L'ADN du vecteur AAV8-NiV.G a persisté dans le temps jusqu'à quatre mois après l'injection mais en quantité inférieure (facteur 5) comparé au vecteur AAV8-GFP. La quantité d'ARN NiV.G est toujours détectable quatre mois après l'administration mais avec un niveau plus faible que pour l'ARN GFP. Des études précédentes ont montré que la protéine GFP induit des réponses immunitaires chez la souris Balb/c et que, malgré la présence de cellules T spécifique de cet antigène, les cellules transduites par des vecteurs AAV-GFP ne sont pas ou peu détruites dans le temps (Gambotto *et al.*, 2000; Mays *et al.*, 2009 ; Lin *et al.*, 2007b). Nos résultats sont en accord avec ces observations, car l'ADN du vecteur AAV8-GFP persiste dans le temps. En revanche pour la protéine G du virus Nipah, la présence d'une quantité d'ADN NiV.G inférieure à celle obtenue pour la GFP signifie que des réponses cellulaires plus efficaces ont été mises en place détruisant une partie des cellules transduites. Cette réponse n'a été que partielle comme le montre la persistance de l'ADN NiV.G quatre mois après administration du vecteur. De plus, la détection d'ARN NiV.G quatre mois après injection suggère que la protéine G est toujours produite. La persistance de l'expression du vecteur AAV-NiV.G et, par conséquent, la production continue de la protéine G pourrait expliquer pourquoi la seconde injection d'AAV a été inefficace (voir Discussion).

En conclusion, l'injection des vecteurs AAV-NiV.G chez la souris nous a permis de conclure que les vecteurs AAV développés sont capables d'induire des réponses humorales fortes contre la protéine G et que le sérotype 8 par la voie IM donne les meilleurs résultats. Une seconde injection de vecteurs AAV dont le but était d'augmenter les réponses observées, n'a pas permis d'augmenter le niveau d'Ac produits. Ceci pourrait être dû à la persistance du vecteur AAV dans le temps et à une synthèse continue de la protéine dans l'organisme.

2.1.2 Immunisation des hamsters par le vecteur AAV8-NiV.G et validation de son pouvoir protecteur contre une épreuve virale

2.1.2.1 Immunisation des hamsters par le vecteur AAV8-NiV.G

Les résultats chez la souris indiquent que les vecteurs AAV-NiV.G induisent une réponse humorale contre la protéine G du virus NiV. Pour valider le pouvoir protecteur de ce vaccin, une épreuve virale consistant à immuniser des animaux puis à les infecter par le virus Nipah sauvage a été réalisée. Le modèle murin n'est pas adapté pour ce type d'expérience car les souris ne sont pas naturellement infectées par le virus NiV et même dans le cadre d'une infection, aucun symptôme n'est observé. En revanche, le hamster doré est

naturellement infecté par ce virus et développe des symptômes similaires à ceux observés chez l'homme (Wong *et al.*, 2003). De plus, cette infection est mortelle chez cet animal.

Pour ces expériences nous avons choisi d'injecter les animaux avec le vecteur AAV8-NiV.G par voie IM. En effet, bien que les résultats obtenus chez la souris ne puissent pas être transposés chez le hamster, ce sérotype est décrit comme ayant un tropisme très large dans de nombreuses espèces animales. Par ailleurs, comme dans notre étude chez la souris, l'AAV8 a été précédemment décrit comme particulièrement efficace pour induire des réponses humorales fortes (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a).

La première étape a été d'administrer par voie IM le vecteur AAV8-NiV.G chez ces animaux afin d'évaluer le type de réponse humorale mise en place (Figure 5 de l'article). Des IgG et des AcN spécifiques de la protéine G sont apparus entre 2 et 4 semaines avec un maximum à la semaine 5. Alors que les IgG totaux ont diminué au cours du temps, les AcN spécifiques de la protéine G sont restés relativement stables jusqu'à la semaine 12, ce qui suggère une augmentation de l'avidité des anticorps anti-NiV.G ou une persistance spécifique des AcN à haute affinité. Comme observé chez la souris, un titre en IgG2a supérieur au titre en IgG1 a été obtenu.

En conclusion, l'injection du vecteur AAV8-NiV.G chez le hamster permet le développement d'IgG et d'AcN spécifiques de la protéine G avec le maximum de la réponse atteint à la semaine 5. L'injection des vecteurs AAV8-NiV.G chez le hamster semble également avoir induit une orientation des réponses immunitaires vers une réponse de type Th1.

2.1.2.2 Protection contre l'infection par le virus Nipah

Afin de valider le pouvoir protecteur de ce vaccin, des hamsters ont été immunisés par le vecteur AAV8-NiV.G ou AAV8-GFP. Cinq semaines après immunisation, les animaux ont été infectés par le virus Nipah sauvage. Une dose de 10 000 pfu a été administrée par voie IP et les animaux ont été suivis quotidiennement sur une période d'un mois.

Les animaux traités avec le vaccin irrelevant AAV8-GFP, servant de contrôle négatif, ont développé des signes cliniques d'infection par le virus NiV, comme des troubles neurologiques, des difficultés respiratoires ou encore des tremblements. Tous ces animaux contrôles ont été euthanasiés 5 jours après infection. L'analyse des organes a montré que des ARN du virus NiV ont été détectés dans le cerveau, les poumons et la rate de ces animaux (ARN du gène *N* et *G*). Aucun anticorps anti-NiV n'a pu être détecté dans le sérum de ces animaux. De plus, une analyse immuno-histochimique du cerveau et des poumons a

révélé la présence des antigènes du virus NiV avec des signes d'inflammation caractéristiques (Figure 6A, 8B, 7A et Supp3 de l'article).

En revanche, tous les animaux vaccinés par l'AAV8-NiV.G, ont survécu jusqu'à la fin du protocole sans développer de signe clinique et sans perdre de poids. Aucun ARN viral n'a pu être détecté et aucune lésion n'a été observée dans le cerveau et les poumons de ces animaux. L'analyse des AcN spécifiques de la protéine G après infection a montré une absence d'augmentation du titre en anticorps pour la majorité des animaux infectés. Seul un animal a eu une augmentation en AcN mais il est à noter qu'il possédait le titre le plus faible en anticorps avant infection par le virus NiV (Figure 6A, 8B, 7A et Supp3 de l'article).

En conclusion, une vaccination des hamsters par l'AAV8-NiV.G permet de protéger 100 % des animaux contre une infection mortelle par le virus NiV. Cette protection est complète et permet l'éradication du virus de l'organisme. De plus, l'absence d'augmentation du titre en AcN après infection suggère que le virus NiV n'a pas eu le temps de se répliquer avant d'être éliminé.

2.1.2.3 Protection contre une épreuve virale par le virus Hendra

Le virus NiV et le virus HeV sont les deux membres du genre des Hénipavirus. Ils sont relativement proches avec environ 83 % d'identité de séquence pour la protéine G (Harcourt *et al.*, 2000). De plus, le hamster doré est un modèle animal utilisé aussi bien pour l'étude du virus NiV que du virus HeV. La plupart des études vaccinales portant sur ces deux virus ont utilisé une protéine G soluble (Bossart *et al.*, 2005a; McEachern *et al.*, 2008; Mungall *et al.*, 2006; Pallister *et al.*, 2011b). Plus particulièrement, il a été montré que la protéine G soluble du virus HeV pouvait protéger des animaux infectés par le virus NiV ce qui démontre une protection croisée (McEachern *et al.*, 2008). En revanche, la réciproque n'a pas été montrée. De plus, les anticorps spécifiques de la protéine G du virus NiV ne peuvent que faiblement neutraliser le virus HeV *in vitro* et *in vivo* (Defang *et al.*, 2011; Guillaume *et al.*, 2009; Mungall *et al.*, 2006). L'ensemble de ces résultats suggèrent que la protéine G du virus NiV ne soit pas capable de cross-neutraliser le virus HeV contrairement à la protéine G du virus HeV. Comme le montre notre étude, le vaccin AAV8-NiV.G permet de protéger 100 % des hamsters infectés par le virus NiV. De par leur proximité et les études réalisées jusqu'à ce jour sur ces deux virus, il est apparu important de déterminer si la protéine G du virus NiV était capable d'induire une protection croisée contre une infection des animaux par le virus HeV. Pour répondre à cette question, la même procédure expérimentale que précédemment a été réalisée pour le virus HeV. Des hamsters ont été vaccinés par le vecteur AAV8-NiV.G ou AAV8-GFP et ont été infectés 5 semaines plus tard par le virus HeV.

Tous les animaux contrôles vaccinés par le vecteur codant pour la GFP ont été euthanasiés entre 4 et 5 jours après infection. Ces animaux ont développé des signes cliniques sévères et ont perdu rapidement beaucoup de poids. La présence du virus HeV a été détectée dans les organes étudiés (cerveau, poumon, rate) et des lésions caractéristiques de l'infection ont pu être observées dans le cerveau et les poumons. En revanche, pour les animaux vaccinés par le vecteur AAV8-NiV.G, 50 % des animaux ont survécu jusqu'à un mois après infection malgré de légers symptômes et une stagnation du poids pendant quelques jours. L'autre moitié des animaux a dû être euthanasiée entre 4 et 7 jours après infection du fait du développement de signes cliniques typiques de la maladie. Aucun ARN du virus HeV n'a été détecté dans les organes des animaux survivants (Figure 6C, 8D, 7B et Supp3 de l'article).

L'analyse des AcN anti-HeV montre que 5 semaines après immunisation des animaux, les anticorps spécifiques de la protéine G du virus NiV sont incapables de cross-neutraliser le virus HeV *in vitro*. En revanche, les animaux survivants sont ceux ayant le titre en AcN contre le virus NiV le plus élevé. Après infection par le virus HeV, les AcN anti-HeV n'ont augmenté que pour 1 animal sur 3. Il apparaît donc que l'AAV8-NiV.G permet également d'induire une protection croisée partielle contre une infection par le virus HeV.

En conclusion de cet article, nous avons montré qu'une seule injection d'AAV-NiV.G induit des réponses humérales de type IgG et AcN spécifiques de la protéine G du virus NiV. De plus, les réponses immunitaires mises en place ont permis une protection complète des animaux face à une infection par le virus NiV et une protection croisée partielle contre le virus HeV.

ARTICLE A.PLOQUIN ET AL.

(Version soumise à Plos Pathogen)

PROTECTION AGAINST HENIPAVIRUS INFECTION USING RECOMBINANT AAV

VECTOR VACCINES

A.Ploquin^{1,2,3,4}, J.Szécsi^{1,2,3,4}, C. Mathieu^{1,2,3,4}, V. Guillaume^{1,2,3,4}, V. Barateau^{1,2,3,4}, K.C. Ong⁵, K.T.Wong⁶, F.L.Cosset^{1,2,3,4}, B.Horvat^{1,2,3,4}, A.Salvetti^{1,2,3,4,*}.

¹ INSERM U758, Lyon, F-69007, France

² Ecole Normale Supérieure de Lyon, Lyon F-69007, France

³ Université de Lyon, UCB-Lyon1, Lyon, F-69007, France.

⁴ LabEx Ecofect, Université de Lyon, Lyon, F-69007, France.

⁵ Department of Molecular Medicine, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.

⁶ Department of Pathology, University of Malaya, Kuala Lumpur, Malaysia.

* Corresponding author:

Anna Salvetti

INSERM U758

Ecole Normale Supérieure de Lyon,

46 Allée d'Italie

69007 Lyon

FRANCE

Tel: 0033 472728980

Fax: 0033 472728137

E-mail: anna.salvetti@ens-lyon.fr

Running head: AAV vectors for vaccination against Henipaviruses

Abstract

Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are closely related, recently-emerged paramyxoviruses, belonging to the Henipavirus genus. Both viruses are capable of causing considerable morbidity and mortality in a number of mammalian species, including humans. Commercially available Henipavirus-specific vaccines are still unavailable and development of novel antiviral strategies to prevent and treat this highly lethal infection in people and economically important livestock is thus highly desirable. The aim of this study was to evaluate the ability of Adeno-Associated Virus (AAV) vectors expressing the NiV G protein to induce a protective immune response. The evaluation of two routes of vaccination and different prime/boost strategies employing three AAV serotypes indicated that a single intramuscular AAV injection in mice was sufficient to induce a potent and long lasting antibody response consisting of both IgG and neutralizing antibodies. Boosting with an alternative AAV serotype only modestly increased this response. Further translational studies in hamsters demonstrated that a single injection of an AAV vector encoding NiV G was sufficient to protect 100 % of the animals against a lethal challenge with NiV. In addition, AAV-induced immune responses against NiV G protein were sufficient to protect 50 % of the animals against a challenge with HeV, thus indicating the induction of cross-neutralizing immune responses. Altogether, this study presents a new vaccination approach whereby a single immunization is sufficient for the induction of a protective immunity against Henipaviruses and opens new perspectives toward the evaluation of AAV vectors as a vaccine against these emergent diseases.

Author Summary

Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are closely related, recently-emerged paramyxoviruses responsible for a high mortality rate in a number of mammalian species, including humans, and therefore causing serious health and economic problems. There is currently no commercially available treatment or vaccine against these viral infections. In this study we have used recombinant vectors derived from the Adeno-Associated Virus (AAV) as a genetic tool to produce a NiV antigen *in vivo* and induce a protective immunity. We showed that a single *in vivo* injection of an AAV vector producing the NiV G antigen can result in a sustained production of specific neutralizing antibodies. This immune response was sufficient to protect 100 % of hamsters against a lethal infection with the homologous NiV. In addition, 50 % of vaccinated animals were also cross protected against an infection with HeV. Altogether, these results provide the basis for future studies toward the development of an efficient preventive vaccine against Henipavirus infection which could be administered to personnel at risk and/or to animals.

Introduction

Nipah virus (NiV) and Hendra virus (HeV) are closely related, recently-emerged paramyxoviruses, belonging to the *Henipavirus* genus. Both viruses are capable of causing considerable morbidity and mortality in a number of mammalian species, including humans (1). NiV and HeV have both emerged in the '90s but in different geographical regions. HeV first appeared in 1994 in Australia and caused mortalities in horses and humans. Since then several outbreaks occurred in Australia with, on each occasion, infection of horses and in five outbreaks transmission to humans. Identification of NiV followed in 1998 in Malaysia, where it caused disease in pigs and humans. Since then approximately 14 outbreaks occurred in India and Bangladesh with clear evidence of human to human transmission and a mortality rate that approached 75 % (2-5). For both viruses, fruit bats are considered to be the natural reservoir and spillover infection is thought to occur through contamination of food sources or direct contact with secretions from infected animals (6). In the case of NiV, transmission of the virus to humans can occur either directly from bats or indirectly through other animal species, such as pigs. In contrast, only indirect transmission through infected horses has been observed in the case of HeV. Infection of humans with Henipaviruses is thought to occur via oral or respiratory route and is characterized by a rapid and widespread diffusion of the virus in several organs in particular lungs, spleen, and brain with symptoms including respiratory distress and encephalitis (7). These symptoms can be reproduced by the experimental infection of several animal models including hamsters, pigs, cats, ferrets and non-human primates (8). Recently, 23 new distinct viral clades closely related to HeV and NiV have been identified in six bat species in five different African countries, thus widening significantly the geographic distribution of these viruses (9). Because of their high pathogenicity in humans, their broad tropism and the absence of any vaccine or treatment, Henipaviruses are presently classified as biosafety level 4 (BSL4) agents and considered as potential biothreats (10).

These two new viruses have a similar genomic structure with unusual long genomes for non-segmented negative RNA viruses, hence their classification into the new *Henipavirus* genus within the *Paramyxoviridae* family. The Henipavirus genome codes for six structural proteins: the attachment (G) and fusion (F) glycoproteins of the viral envelope, nucleoprotein (N), large polymerase (L) and phosphoprotein (P) - that constitute the virus nucleocapsid, and the matrix protein (M), which connects the nucleocapsid to the viral envelope. The open reading frames of the two viral genomes are 71 to 78 % identical, depending on the gene, with the highest identity for the N gene. Infection of cells by Henipaviruses is mediated by the action of their envelope glycoproteins, G and F. Both Nipah and Hendra virus use commonly EphrinB2 or Ephrin B3 as cellular receptors (11).

A major vaccination strategy to prevent Henipavirus infection has focused on direct administration of soluble forms of F and/or G proteins to induce a protective immune response. In particular, injection with soluble forms of recombinant NiV or HeV G proteins resulted in a protective and sometimes sterilizing immunity in several animal models including cats and ferrets (12-15). This form of vaccination requires several injections of high doses of recombinant proteins coupled to adjuvants in order to achieve a significant immune response. Other vaccination strategies have used recombinant viral vectors to directly express the G and/or F glycoproteins of NiV or HeV *in vivo*. In particular, recombinant vectors derived from Vaccinia or Canarypox viruses were shown to be able to induce a humoral response against the NiV G protein which could protect hamsters and pigs, respectively, against a challenge with wild type (wt) NiV (16,17). Canarypox vaccine which is currently undergoing development as a veterinary vaccine, requires multiple injections to induce an efficient humoral response. More recently, recombinant viruses derived from the Venezuelan Equine Encephalitis virus and Vesicular Stomatitis Virus have been shown to induce a humoral response against the NiV or HeV G glycoproteins in mice, but protection against NiV infection has not been evaluated (18,19).

We here evaluated a vaccination strategy based on the use of recombinant vectors derived from Adeno-Associated Virus (AAV). AAV vectors are currently considered as powerful tools for *in vivo* gene transfer. Indeed, AAV vectors are able to transduce a wide variety of tissues *in vivo* leading to a strong and sustained expression of the transgene (20). These properties have led AAV vectors to progressively gain greater importance in the field of gene therapy with several examples of successful gene transfer both in animals and humans (21). In contrast, the use of AAV vectors for vaccination purposes has only recently been investigated in detail and only few studies have documented the potential of these vectors to induce a protective immunity against a viral infection (22-28).

In this study we evaluated the ability of AAV vectors expressing the NiV G protein to induce a protective immune response. The comparison of three different AAV serotypes and two vaccination routes indicated that a single injection in mice of an AAV8 vector expressing NiV G (AAV8-NiV.G) was sufficient to induce a potent and long lasting Ab response consisting in both IgG and neutralizing antibodies (NAb). Boosting with an alternative AAV serotype only modestly increased this response. These studies were further extended to the hamster animal model, which is highly susceptible to Henipavirus infection, and which closely reproduces the pathology seen in humans (29). Our results demonstrated that a single injection of the AAV8-NiV.G vector was sufficient to fully protect the hamsters against a lethal challenge with NiV. In addition, AAV-induced immune responses against NiV G protein were sufficient to protect 50 % of the animals against a challenge with HeV, thus indicating

the induction of cross-protecting immune responses. These findings open new perspectives for the development of AAV vectors vaccines against Henipaviruses.

Results

Characterization of AAV-NiV.G induced humoral immune responses after rAAV injection in mice

The first part of our study was focused on the characterization of the AAV-induced anti-NiV G immune responses. For these preliminary experiments we choose to work in a murine model which, even if not suitable to study NiV infection, facilitated the comparisons of several vaccination conditions.

Three AAV serotypes were chosen to define the optimal protocol for induction of anti-NiV G Ab (Figure 1). The AAV serotypes chosen were AAV1 for its ability to efficiently transduce the muscle (30), AAV8 for its broad tropism (31), and AAVrh32.33 a recently isolated variant that demonstrated a superior capacity to induce cellular immune responses to the transgene product compared to the other AAV serotypes (25,32). The vector encoding for NiV G protein was packaged into each of these serotype capsids that were injected either intramuscularly (IM) or intradermally (ID), two routes that are generally used in vaccination protocols. A vector encoding the non-immunogenic murine secreted alkaline phosphatase (mSEAP) was used as negative control (33). In order to visualize the Ab responses against the NiV G protein induced after the first AAV injection, sera of mice were first analysed by ELISA (Figure 2A). For all three AAV-NiV.G serotypes, anti-NiV G Ab were detected between 4 and 6 weeks post-prime independently of the injection route. This delay likely reflected the time required to achieve a maximal expression of the transgene encoded by the single-stranded AAV vectors (34). The Ab level peaked between 8 to 12 weeks depending on the serotype and the injection route but then remained stable until 16 weeks post prime, except for AAV1 injected IM. Humoral responses generated after ID injection were significantly lower than those observed after IM injection and only minor differences were observed among the three AAV serotypes. In contrast, as previously documented, AAV8 was superior to the two other AAV serotypes in terms of kinetics and Ab level when injected IM (25,26).

To better characterize the Ab response, titers of IgG1 and IgG2a subclasses were determined by ELISA. The results shown in Figure 2B indicated that both IgG1 and IgG2a isotypes were detected for each AAV serotype independent of the injection route. Interestingly, however, AAV8 injection via the IM route induced a dominant IgG2a response which was observed neither with the other AAV serotypes nor via the ID route.

We next detected the production of anti-NiV NAb using a neutralization assay based on the use of NiV virus-like particles (NiV-VLPs) (see Material and Methods). As expected from the follow up of IgG responses, NAb against NiV were first detected 4 to 6 weeks after immunization and their level increased until 12 to 16 weeks post prime (Figure 2C). For both immunization routes, the AAV1-NiV.G vector was the less efficient in terms of kinetics of NAb produced until 16 weeks post-immunization. Also, as observed for IgG responses, the AAV8-NiV.G vector induced the strongest and the most rapid NAb response by the IM route.

Few studies on AAV vaccines have documented that Ab titers generated after injection of AAV vectors can be significantly increased following a boost with a heterologous vector such as an Adenoviral vector (25,26). In this study we wished to examine the possibility to use an alternative AAV serotype to allow escape from the serotype specific anti-AAV NAb generated after the prime. Among the three serotypes used for the prime, AAVrh32.33 was the one with the most divergent capsid and was described as able to induce robust T and B cell responses (25,32). Therefore, we reasoned that it should be the best candidate to enhance the humoral responses of mice primed with either AAV1 or AAV8. The boost injection was performed at week 16 (Figure 1), a time at which Ab responses had reached a plateau in nearly all groups of animals (Figure 2). Interestingly, only a moderate increase of IgG or NAb titers was observed 4 weeks after the boost injection (Figure 3A and B). Similarly no effect of the boost vaccination was observed on the level of IgG isotypes. In particular the boost did not significantly alter the dominant IgG2a response observed after AAV8 IM injection (data not shown). Importantly, the detection of anti-AAV capsid NAb confirmed that the inefficient boost effect was not due to a pre-existing prime-induced cross-neutralizing Ab response (Figure S1).

Altogether these results indicated that a strong and persistent humoral response to NiV G could be obtained after a single injection of AAV1, AAV8 or AAVrh32.33 vectors which was not significantly enhanced by a booster injection with an alternative AAV serotype. In addition the results showed that an AAV8 vector injected by the IM route induced the highest levels of IgG and NAb.

Analysis of vector persistence over time

Our results indicated that a single AAV injection resulted in a long lasting humoral response against NiV. This observation suggested that AAV-NiV.G vectors could persist and continue to express despite the development of an immune response against the vector-encoded antigen. In order to examine this point we analyzed the persistence of an AAV8-NiV.G vector during the first 16 weeks after the prime and compared it to an AAV8 vector encoding GFP.

The measure of AAV-GFP DNA copies in the injected muscles over time indicated that after an initial drop at two weeks post-injection (p.i.), likely due to the elimination of non-internalized vector particles and/or degradation of vector DNA (35), AAV-GFP copies remained stable until at least 16 weeks (Figure 4A). As expected, follow up of AAV-NiV.G vector persistence indicated an increased elimination of vector DNA at 6 weeks post-injection as compared to AAV-GFP samples which was likely due to the emergence of an immune response against the NiV G protein. However, interestingly, AAV-NiV.G vector DNA levels remained stable thereafter. Quantification of NiV G RNA at 16 weeks p.i. indicated that the transgene was expressed at a detectable level which was, as expected, significantly below that observed for the GFP transgene (Figure 4B).

These results indicated that AAV vector DNA was still present and at least part of it continued to express the transgene four months p.i.

Protection against NiV infection in the golden hamster model

As mice are not susceptible to Henipavirus infection, we next evaluated AAV vaccination in golden hamsters, an animal model currently used to study Henipavirus pathogenesis (29,36).

For these experiments we chose to inject animals with the AAV8 NiV.G vector via the IM route. Indeed, this serotype which resulted in the highest level of anti-NiV G Ab in mice (Figure 2A and C) has also been extensively used in several animal species, including humans, and shown to be able to efficiently transduce several tissues including muscle. We initially monitored the level of anti-NiV G humoral response over time. The follow up of the anti-NiV G IgG response by ELISA during the first 12 weeks p.i. indicated a different kinetics than that observed in mice (Figure 5A), with an early onset of Ab production at 2 weeks p.i. which peaked between 4 to 6 week p.i. and then progressively declined until week 10 and remain stable thereafter. Interestingly, as previously observed in mice, a dominant IgG2 response was induced (Figure 5B). The NAb levels followed the same kinetics as the IgG levels with an earlier onset and peak between 4 to 6 weeks p.i. Furthermore, the NAb remained stable until at least 12 weeks p.i., further suggesting the persistent induction of high affinity NAb (Figure 5C).

Previous studies have shown that intraperitoneal (IP) infection of hamsters with NiV is lethal 5 to 6 days post-challenge (dpc) and that less than 24 hours before death, animals develop clinical signs including tremor and limb paralysis. Encephalitis and severe lesions in multiple organs including the lungs were regularly observed in infected animals (29). Our results in mice and hamsters have indicated that a single injection of an AAV8-NiV.G vector was sufficient to induce a persistent level of NAb. Therefore, to verify whether the level of Ab

responses achieved after AAV injection was sufficient to protect the animals against a challenge with NiV, vaccinated animals were injected IP with a lethal dose of wt NiV at the peak of the NAb response. Control animals injected with AAV8-GFP and similarly challenged were used as a negative control. The animals were followed for the appearance of clinical signs (body weight, dyspnea, tremor, and limb paralysis) and for ethical reasons, when possible, they were euthanized before the full development of the disease. The survival curve is shown Figure 6A. All control animals, injected with AAV8-GFP, developed the clinical signs at day 5 post-challenge. In contrast, 100 % of vaccinated animals survived until the end of the experiment without appearance of clinical signs and with a progressive increase in body weight (Figure 6B). To monitor NiV infection, the level of anti-NiV NAb was analyzed pre- and post-challenge in the sera of vaccinated animals. For technical reasons linked to the work conditions in the BSL4 laboratory it was not possible to perform the neutralization assays using NiV-VLPs. Instead, a neutralization assay using wt NiV and based the inhibition of the cytopathic effect induced by the virus on Vero cells, was used (see Material and Methods). The analysis of several pre-challenge sera indicated a strong correlation between these two assays (Figure S2A) although wt NiV NAb titers were on average 10 to 20 fold inferior to those observed using NiV-VLPs (Figure S2B). This explains why pre-challenge NAb levels were nearly undetectable in three out of 6 vaccinated animals with the wt NiV assay (Table 1) despite a detectable level measured using the NiV-VLPs assay (Figure 5C and data not shown). The analysis of post-challenge sera indicated that five out of six vaccinated animals did not develop an anamnestic response (Table 1). The detection of NiV RNA by RT-qPCR performed in different organs of the infected animals, indicated that, as expected, NiV RNA was found in the lung and the spleen and to a lower level in the brain of control animals (Figure 7A and Table 1). In contrast, NiV RNA was undetectable in the organs from all vaccinated animals including the one displaying a post-challenge increase in anti-NiV NAb (animal NiV.G-5) (Figure 7A and Table 1). Immunohistochemistry performed on selected organs further confirmed the absence of detectable NiV antigens in vaccinated animals (Figure S3). In unvaccinated animals, viral antigens were detected in blood vessels and parenchymal cells. Altogether, these results strongly suggested that a single injection of the AAV8-NiV.G vector was able to induce a sterilizing immunity against NiV infection.

Analysis of cross-protection against HeV infection

Some studies have shown that *in vivo* delivery of a soluble HeV G protein can result in cross-protection against both Hendra and Nipah virus (12-14). In contrast, the NiV G protein is generally believed to be less able to induce a cross-protective immunity as Ab against NiV G protein were found unable to efficiently cross-neutralize HeV *in vivo* (17,36).

In order to evaluate this point, animals vaccinated with AAV8-NiV.G were challenged with HeV, using the same condition as for NiV challenge. The follow up of the animals indicated that three out of six animals survived the challenge despite a transient loss of weight (Figure 6C and D). The analysis of anti-HeV NAb indicated that, as expected, none of vaccinated animals had detectable anti-HeV cross-neutralizing NAb before challenge (Table 2). After challenge, only one out of the three surviving animals developed anti-HeV NAb (animal NiV.G-9) thus suggesting a transient replication of the virus. However, viral RNA was not detected in the organs of any of the animals surviving the challenge (Table 2 and Figure 7B). Similarly, HeV antigens were not detected by immunohistochemistry (Figure S3). Altogether, these results indicated that vaccination with AAV8-NiV.G was able to induce a cross-protective immunity sufficient to protect 50 % of the animals against a lethal challenge with HeV.

Discussion

Strategies to prevent Henipavirus infection can be either preventive or therapeutic (37). For viruses that cause such sporadic outbreaks a therapeutic treatment after virus contact seems the most suitable. Accordingly, recent efforts have focused on the development of a monoclonal antibody capable of recognizing the G glycoprotein of both NiV and HeV (38-40). However, because the virus can rapidly replicate and spread after entry, this strategy has a very narrow therapeutic window. Consequently, preventive vaccination remains a suitable alternative, at least to protect people who may be in contact with infected animals and susceptible livestock, particularly pigs and horses, to avoid the economic disaster this infection may cause. In addition, as NiV is considered as a potential biological weapon, vaccination may be important to fight against a bioterrorism.

Vaccination strategies against Henipavirus infection have mostly been based on the direct injection of high doses of soluble viral glycoproteins mixed with adjuvants to induce a protective humoral response. These strategies which have mostly employed a soluble HeV G protein have proven to be efficient in animal models of Henipavirus infection such as cats and ferrets (12-14). Alternative strategies based on viral vectors expressing Henipavirus antigens have also been reported but except for Canarypox, these vectors are not currently used in humans (16-19).

In this study we examined the possibility of using AAV vectors as a vaccination tool against NiV and HeV. Several arguments are in favor of the use of AAV vectors as vaccines in particular against Henipaviruses. Firstly, AAV vectors are derived from a non-pathogenic virus and their overall absence of toxicity has been documented in several pre-clinical and

clinical studies (21,41). In particular AAV vector genomes persist mainly as extra-chromosomal episomes thus considerably reducing the risks of insertional mutagenesis (42-44). Secondly, the wide tropism of AAV and the existence of several AAV serotypes allow efficient gene transfer via different injection routes, and in numerous, if not all animal species (45). Thirdly, procedures for large scale production of highly purified stocks of these vectors have already been developed for application in clinical trials (46,47). Finally, previous studies have suggested that a single injection of AAV vectors can result in an efficient and sustained production of antibodies (Ab) against the transgene product, which can be boosted using a heterologous vector such as Adenovirus (24,25,48-50). It was suggested that the low intrinsic immunogenicity of the AAV particle itself, compared to other vaccination vectors, may provide an advantage for Ab production by inducing a more prolonged expression of the antigen.

We here demonstrated that a single IM injection of an AAV vector encoding for the NiV G protein can induce a sustained humoral response which was sufficient to protect hamsters against a lethal challenge with NiV. In addition, we also showed that this mode of vaccination could result in a partial cross-protection against HeV.

The first part of our study was focused on the characterization of the AAV-induced humoral response by comparing three different AAV serotypes and two injection routes (IM and ID). We found that the AAV8 vector injected IM was the most efficient for the production of anti-NiV G Ab (Figure 2A and C) thus confirming previous studies which had also identified this serotype as the most potent for the induction of the humoral response (25,26). In both IM and ID routes, the kinetics of anti-NiV G Ab was characterized by a delayed detection at 4- 6 weeks after injection with a peak of production at 8-12 weeks p.i. This unusual lag phase before antibody detection was previously documented in other studies (26,27) and it is likely due to the time required for the conversion of single-stranded (ss) AAV vector genome into a double-stranded (ds) DNA form able to express the transgene (51). Therefore, the use of ds AAV vectors, which can circumvent this rate-limiting step and accelerate the synthesis of the antigen may improve the kinetics of Ab production. In addition, such vectors, which usually result in a higher level of transgene expression (51), may also improve the humoral response quantitatively. Another major characteristic of AAV-induced humoral response was its persistent detection at a high level for an extended period of time (Figure 2). Many groups have similarly documented a persistent AAV-induced humoral response (24,49,50). In this study we observed that the Ab response was stable for at least 16 weeks in mice. Analysis of vector sequences in transduced tissues indicated that AAV DNA and RNA were still present at 16 weeks p.i. albeit at lower levels compared to the AAV-GFP vector (Figure 4). This result suggests that the persistent Ab level may be due to a low but continued expression of the transgene. In contrast, a decline in IgG was observed five weeks p.i. in hamsters further

suggesting a reduced vector persistence in this animal species (Figure 5A). Future studies comparing a range of AAV MOIs in hamsters and mice will indicate whether these differences are linked to host species or to the vector doses. Additional studies should also be performed to compare the immune responses induced by AAV vectors to those obtained after repeated injections of soluble G protein (52). Finally, we have observed that a boost injection performed at 16 weeks post-prime with an alternative AAV serotype did not significantly enhance the Ab level (Figure 3A and B). Similar results were previously observed by Logan *et al.* who did not observe an increase in Ab titer in a prime-boost strategy performed with AAV1 and AAV3 (53). In contrast several other studies have documented the possibility of boosting the AAV-induced humoral response using a different mode of vaccination, in particular using an Adenoviral vector (25-27). In our study we confirmed that the absence of a booster effect was not due to induction of cross-neutralizing anti-AAV Ab following the prime (Figure S1). The lack of a booster effect may be because the same type vector, even if able to escape anti-AAV neutralizing response, will stimulate identical immune pathways as the prime. More likely, it is possible that a booster effect could be observed only if performed at later time, when the humoral response induced by the prime has declined and vector DNA/RNA has become undetectable. For these reasons, additional studies should also be performed to determine whether these observations can be transposed to other animal species.

In the second part of our study we analyzed whether the level of AAV-induced humoral responses induced by a single AAV injection was sufficient to protect the animals against a lethal challenge with Henipaviruses. All vaccinated animals were protected against a lethal challenge with NiV (Figure 6A). The absence of NiV antigens (Figure S3) and RNA (Figure 7A and Table 1) in the tissues strongly suggested that this mode of vaccination induced a sterilizing immunity. Accordingly, a moderate anamnestic response was only observed in one out of six animals (Table 1). Importantly, in this initial study the challenge with NiV was performed at the peak of the humoral response to determine whether the level of anti-NiV G Ab achieved with a single injection was sufficient to protect the animals. Therefore it will be critical in the future to similarly analyze animals at a time when the humoral response has returned to a baseline level, to correlate the level of protection with the level of anti-NiV NAb. Our data indicate that protection can be achieved irrespective of the individual level of anti-NiV NAb and therefore strongly suggest that even a very low NAb titer is sufficient to confer protection (data not shown). This protection may also be associated with the generation of a cellular immune response, which would require the development of new tools for a complete analysis in hamsters.

NiV and HeV G proteins are 83 % homologous (54,55). This relatively high level of homology suggests that cross-neutralizing response can be induced. Accordingly, Ab developed against

the HeV G protein have been reported to cross-neutralize NiV (38,39,56). In contrast, the NiV G protein is generally believed to be unable to induce an efficient cross-protective response *in vivo*. Interestingly, we observed that 50 % of the animals vaccinated with AAV-NiV.G were also protected against a challenge with HeV (Figure 6C). This surprising result suggests that a low level of cross-neutralizing Ab against HeV, were induced upon vaccination even if such Ab were not detectable by the neutralization assay using wt HeV (Table 2). Alternatively, it is possible that protection is conferred upon induction of a cell-mediated immune response. Cellular responses against Henipavirus glycoproteins have not been characterized so far. However, it is likely that cellular and particularly CD8⁺ T cell responses against these glycoproteins can be induced and may play a role in protecting the animals. Likewise, CD4⁺ Th1 responses may also be involved in the protection consecutive to vaccination. This cell population can secrete different cytokines, including interferon gamma (IFN γ), and efficiently participate in virus elimination in the periphery as well as in the central nervous system as reported in other viral infections (57). Accordingly, CD8⁺ T cell responses have been observed in the case of Measles virus, another member of the *Paramyxoviridae* family (58). Furthermore, induction of an adaptive Th1 immune response against NiV G has been suggested to occur following injection of Canarypox vectors encoding NiV G in pigs (17). Interestingly, we found that IM injection of the AAV8-NiV.G vector induced a dominant IgG2a response which was observed neither with the other AAV serotypes nor via the ID route (Figures 2B and 5B). This result which was confirmed in two different animal species suggests that this capsid serotype may induce a Th1-oriented immune response. Future protection studies involving a challenge at earlier time points, prior to the onset of an optimal antibody response will be indicative of cellular responses that can participate to the protective effect. In addition, adoptive transfer of T cells should indicate to which extent cellular responses against NiV G can protect against viral infection. This latter type of experiments will however require the development of murine models of Henipavirus infection, for which a full spectrum of reagents are available.

Several AAV serotypes, including AAV8, have been shown to be unable to induce an efficient memory T cell response (26,27). Therefore, future studies on cellular responses to explore the immunological basis of vaccination against Henipaviruses should include the AAVrh32.33 serotype which was specifically selected for its ability to induce qualitatively and quantitatively superior cellular response (25).

Altogether, these results demonstrate that AAV vectors constitute a powerful genetic platform for the *in vivo* expression of Henipavirus antigens. They also indicate that they can be advantageously used to further explore the immunological basis of anti-Henipavirus vaccines and to develop new prophylactic strategies. These could include the evaluation of other routes vaccination, notably the intranasal route to induce a mucosal immunity (50,59),

as well as the expression by the vector of other viral antigens, notably those derived from HeV, to further improve the cross-reactive response.

Materials and Methods

Ethics Statement

All animals were handled in strict accordance with good animal practice as defined by the French national chart on the ethics of animal experimentation. Animal work in mice and hamsters was approved by the Regional ethical committee (CECCAPP, protocol N°69387390 and P4_2011_013). Experiments in mice and hamsters were performed in the SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS344/US8) and Valbex animal facility, respectively (French Animal regulation committee N° B 69 123 0303 and A692661101). Experiments with NiV and HeV in hamsters were performed in the INSERM Jean Mérieux BSL-4 laboratory in Lyon, France (French Animal regulation committee N° A69 387 05 02).

Cell lines and viruses

Human cervical epithelial cells (Hela), African green monkey kidney fibroblasts (Vero) and Human kidney epithelial cells (HEK-293 and 293T) were maintained in Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM, Life Technologies, France) supplemented with 10 % fetal calf serum (FCS, Perbio Science) and 1 % penicillin-streptomycin (5,000 U/mL, Life Technologies). NiV (isolate UMMC1, Genbank AY029767) and HeV, obtained from Porton Down laboratory UK, were prepared by infecting Vero-E6 cells, in the INSERM Jean Mérieux biosafety level 4 (BSL-4) laboratory in Lyon, France.

Plasmids

The pAAVhCMV-NiV.G vector plasmid contains the cytomegalovirus promoter (CMV), the chicken γ -globin intron, the NiV G cDNA and the rabbit β -globin polyA, flanked by the AAV2 inverted terminal repeats. It was obtained by inserting the NiV.G expression cassette derived from the phCMV-NiV.G plasmid (kindly provided by R.Buckland, INSERM U758, France) into the SSV9 AAV vector. The pAAVhCMV-mSEAP vector plasmid encoding for the mouse secreted embryonic alkaline phosphatase was obtained from A.Galy (Genethon, France). The pAAV-GFP vector plasmid contains the enhanced green fluorescent protein cDNA driven by the CMV promoter. The phCMV-NiV.Gs plasmid encoding for a soluble NiV G protein was obtained by removing the N-terminus cytoplasmic and transmembrane domains of the NiV G

protein to replace them with a Murine Leukemia Virus (MLV)-derived signal peptide and a 6xHistidine-tag.

AAV vector production

Stocks of AAV vector particles were generated by calcium phosphate transfection of HEK-293 cells as described previously (60). The helper plasmids used for production were pXX6 (Xiao, Li, and Samulski, 1998), pDF1 (61), pDG8 (a kind gift from P. Moullier, INSERM U649, France), and pAAVrh32.33 (a kind gift from J. Wilson and L. Vanderberghe, University of Pennsylvania, USA) (25). The vector particles were purified on double cesium chloride gradient and titered by dot blot and quantitative PCR (qPCR). AAV titers were in the range of 1.10^{12} to 1.10^{13} genome particles/mL (gp/mL).

Animal immunization and samples collection

Six-weeks old Balb/c male mice (Charles River, Lyon, France), maintained in the animal facility of ENS-Lyon (PBES), were injected with AAV vectors either IM in the tibialis anterior muscle (2.10^{10} AAV gp in 40 μ l of Phosphate Buffered Saline (PBS)) or ID in the ear (1.10^{10} AAV gp in 20 μ l of PBS). For experiments in hamsters, eight weeks-old female outbred golden hamsters (*Mesocricetus auratus*, Janvier, France) were maintained in the animal facility of Valbex (University of Lyon, France). Five to six golden hamsters per group were immunized by IM administration of AAV8-NiV.G vectors (6.10^{11} AAV gp in 100 μ l of PBS). Blood samples were collected at indicated times under anaesthesia with isofluorane. Sera were heated at 56°C during 30 minutes, aliquoted and frozen at -80°C. The organs collected after euthanasia were immediately frozen at -80°C.

Challenge with NiV and HeV

For challenge with NiV or HeV, animals identified by microchips were housed in ventilated containers equipped with HEPA filters in the BSL-4 laboratory. Vaccinated hamsters were injected IP with NiV or HeV (10,000 pfu) in 0.4 mL after anesthetization with isofluorane. Animals were observed daily for the appearance of clinical signs (behavior, body weight) and immediately euthanized in case of symptoms such as shaking, loss of balance or paralysis. Animals that survived the challenge were euthanized at 29 dpc. Blood and tissue specimens (brain, lung and spleen) were collected for NiV or HeV detection by RT-qPCR analysis and by immune-staining. Blood samples were harvested from non-vaccinated or vaccinated animals on day 0, 5, and eventually later on at 12 and 29 days p.i.

ELISA

Stocks of NiV G soluble protein were produced by calcium-phosphate transfection of HEK-293 cells with the phCMV-NiV.Gs plasmid. Forty-two hours later, the supernatant containing the NiV G soluble protein was collected and stored at -80°C.

Plates pre-coated with Ni-NTA nickel complexes and pre-blocked with BSA were used for the ELISA (Qiagen). Plates were coated overnight at 4°C with either NiV Gs-containing supernatant or supernatant from mock transfected cells diluted in 1X TTB (Tris Buffered Saline /0.05 % Tween20/2.5 % BSA). After four washes with TTB, serial dilutions of sera were added for 2 h at room temperature (RT), followed by incubation with the secondary antibodies diluted in TTB for 1 h at RT. Plates were finally washed four times with TTB, twice with 1XTBS, and incubated with a 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine (TMB) substrate (Sigma-Aldrich). The reaction was stopped by adding 1N HCl and the optical density was measured at 450 nm (O.D._{450 nm}). The value for each serum sample was corrected by subtracting the O.D. measured with control coated wells (Δ O.D._{450 nm}). An internal control anti-NiV G serum and hybridoma were added in each ELISA plate to correct for possible variation between plates. The secondary antibodies were purchased from Southern Biotech and used at the following dilutions: HRP-goat anti-mouse IgG (1/10,000), HRP-goat anti-mouse IgG1 (1/10,000), HRP-goat anti-mouse IgG2a (1/10,000), HRP-goat anti-hamster IgG (1/5,000), HRP-mouse anti-hamster IgG1 (1/1,000), HRP-mouse anti-hamster IgG2 (1/5,000).

Seroneutralization assays

Neutralization assay using NiV-Virus Like Particles (NiV-VLPs)

NiV-VLPs were produced as previously described by Szecsi et al. (63). Briefly, VLPs derived from MLV core particles pseudotyped with NiV glycoproteins were produced in 293T cells by transient transfection of plasmids pTG5349 and pTG13077, with phCMV-NiV.GΔ20 and phCMV-NiV.FΔ24 plasmids (Mathieu et al., 2011). VLPs containing supernatants were harvested 48 h after transfection. VLPs were concentrated on a 20 % sucrose cushion by ultracentrifugation (110,000 g for 2 h; Beckman SW28) and stored at -80°C. Particles were titered by infection of Hela cells with various dilution of VLP stock. Three days p.i. GFP-expressing cells were analysed by FACS (Canto II, BD Bioscience). NiV-VLPs titers were in the range of 5×10^5 infectious particles/mL (ip/mL). Control VLPs were similarly obtained by replacing the NiV G and F-expressing constructs with a plasmid coding for the Vesicular Stomatitis Virus (VSV) G protein.

For the neutralization assay, Hela cells were seeded at 2×10^4 cells per wells in a 96 wells plate. The next day, serial dilution of sera were mixed with a 1×10^3 VLPs ip, incubated 1 h at 37°C, and then added on Hela cells overnight at 37°C. Each serum dilution was tested in

duplicate. The day after 200 µl of medium was added to the wells and plates were incubated at 37°C for 48 hours. The transduction efficiency was determined by the percentage of GFP-positive cells by FACS analysis 72 h after transduction. The results were expressed as the percentage of reduction in the infectious VLPs GFP titer induced by the immune serum samples relative to a preimmune serum sample. For the time course experiments, mice and hamster sera were used at a 1/100 or a 1/20 dilution, respectively. The NAb titer was defined by the reciprocal of the last dilution of serum which resulted in 50 % of neutralization.

Neutralization assay with NiV and HeV in the BSL4 laboratory

NiV and HeV neutralizing antibodies were assayed using two-fold dilutions of serum, as described previously (Guillaume et al., 2009). Diluted sera were incubated with virus (25 PFU/well in 96-well microtiter plates) for 60 min at 37°C in DMEM supplemented with 2 % FCS. A total of 2×10^4 Vero cells were then added to each well as indicator cells, and the 96-well plates were incubated for 4-6 days at 37°C. The cytopathic effect was revealed by staining cells with crystal violet and relative neutralizing titers are defined as the reciprocal of the dilution of sera samples that completely inhibited the cytopathic effect of either NiV or HeV.

qPCR analyses

For the extraction of RNA, approximately 30 mg of tissues were mechanically crushed for 5 min in a tube containing glass beads and further processed following the manufacturer's instructions (RNeasy Mini kit, Qiagen). Purified RNAs were additionally treated with Turbo DNase I (Ambion, Life Technologies), and then reverse transcribed into cDNA using the qScript cDNA Super Mix (Quanta Biosciences). qPCR reactions to amplify NiV N and G cDNAs were performed using the previously described set of primers (64). For HeV primers used were: HeV N (5'-GCCGGCTTCTTTGCGACTATC-3'/ 5'-CGCTCGAGGCCCTATTCTCTG-3'); HeV G (5'-GGGATCCAAGATAAGTCAGTCT-3'/5'- AAAGGCAAAGGATTCGGACAAG-3'). Primers hybridizing to the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) cDNA were used to normalize the samples (5'-GCATGGCCTTCCGTGTTC-3'/5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3').

Total genomic DNA (gDNA) was extracted from 20 mg of tissue using the Wizard® SV Genomic DNA Purification System (Promega) following the manufacturer's instructions.

The qPCR reaction was conducted on 10 ng of cDNA or gDNA using the FastStart Universal SYBR Green Master reagent (Roche Diagnostics) according to the manufacturer's guidelines. qPCR was run on the Step One Plus Real Time PCR system (Applied Biosystems). NiV.G DNA was amplified using the set of primer described in ref. (Mathieu et al., 2011). The other

primers used to detect GFP and CMV sequences were the following: GFP (5'-ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'/ 5'-CTCGCCGGACACGCTGAACT-3'); CMV promoter (5'-ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG-3'/ 5'-CCCGTGAGTCAAACCGCTATCC-3'). Primers hybridizing to the CD8a DNA were used to normalize the samples (5'-GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC-3'/5'-GCAGACAGAGCTGTTTCCTATGTG-3'). All samples were run in duplicate, and the results were analyzed using the ABI StepOne software v2.1.

Statistical analyses

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean (SEM). Statistical analyses were performed using the two-tailed Student's T or ANOVA-1 test with the GraphPad software. Differences were considered significant when $p < 0.05$.

Accession numbers

NiV.G NC_002728 NP_112027 GeneID: 920955

NiV.N NC_002728 NP_112021 GeneID: 920951

HeV.G NC_001906 NP_047112 GeneID: 1446471

HeV.N NC_001906 NP_047106 GeneID: 1446470

Supplemental Material and Methods

Immunohistochemistry on hamster tissues

Paraformaldehyde-fixed and paraffin embedded tissues were sectioned at 4 μ m and routinely stained with hematoxylin and eosin. Immunohistochemistry was performed by a modified standard ENVISION System (DakoCytomation, Denmark) as previously described (Guillaume et al., 2009). Briefly, tissue sections were dewaxed in xylene and rehydrated through graded ethanol washes before heat-induced, antigen retrieval in citrate buffer (pH 6) at 99°C for 30 min. Endogenous peroxidase activity was quenched by incubation with 3 % hydrogen peroxide in methanol for 20 min before incubation with primary cross-reacting, polyclonal mouse anti-Hendra antibody (1:500 dilution; gift from Dr.Zaki SR, CDC Atlanta, USA) was applied. This was followed by rabbit/mouse secondary antibody conjugated to horse radish peroxidase and incubation with the DAB substrate (DakoCytomation, Denmark).

Neutralization assay against AAV particles

Hela cells were seeded at 1.5×10^4 cells per wells in a 96 wells plate. The next day, sera of vaccinated mice (n=5) were diluted 1/100 and mixed with 4×10^8 AAV-GFP gp, incubated 1 h at 37°C and then added on cells. The day after, 200 µl of medium was added to the wells and plates were incubated at 37°C for 48 hours. The transduction efficiency was determined by the percentage of GFP-positive cells by FACs analysis, 72 h after transduction. The results were expressed as the percentage of reduction of the infectious AAV-GFP titer induced by the immune samples relative to preimmune serum samples.

Acknowledgments

We are grateful to Nelly Jolinon for excellent technical assistance. We acknowledge the contribution of Isabelle Grosjean from the CelluloNet facility for the production of anti-NiV.G hybridomas and all personnel of the platforms of SFR Biosciences Gerland-Lyon Sud (UMS344/US8) for their help. We also thank F. Jacquot and the other team members of the BSL-4 Jean Mérieux laboratory (Lyon, France), and Alain Dorier from the “Centre d’experimentation Valbex” (Lyon, France) for their assistance. This work was supported by INSERM, Université Claude Bernard Lyon-1 and Ecole Normale Supérieure de Lyon. It was funded by grants from INSERM and the Direction Générale à la Sante (to AS), The Direction Générale à l’Armement (DGA) and Fondation pour la Recherche Médicale (PhD fellowship to A.P.), the European Research Council (ERC-2008-AdG-233130-HEPCENT grant to FLC), and the University of Malaysia (HIR grant H20001-E000004 to KTW).

Author contributions

Conceived and designed the experiments: AP, BH and AS. Performed the experiments: AP, JS, CM, VG, VB, KCO. Analyzed the data, AP, JS, BH, FLC, KTW, AS. Contributed to reagents/materials/analysis tools: JS, CM, VG, BH, FLC, KTW. Wrote the paper: AP, AS.

References

1. Eaton BT, Broder CC, Middleton D, Wang LF (2006) Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nature Rev Microbiol* 4: 23-35.
2. Chua KB, Goh KJ, Wong KT, Kamarulzaman A, Tan PS, et al. (1999) Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* 354: 1257-1259.
3. Hess IM, Massey PD, Walker B, Middleton DJ, Wright TM (2011) Hendra virus: what do we know? *N S W Public Health Bull* 22: 118-122.
4. Luby SP, Hossain MJ, Gurley ES, Ahmed BN, Banu S, et al. (2009) Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* 15: 1229-1235.
5. Murray K, Selleck P, Hooper P, Hyatt A, Gould A, et al. (1995) A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* 268: 94-97.
6. Halpin K, Hyatt AD, Fogarty R, Middleton D, Bingham J, et al. (2011) Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* 85: 946-951.
7. Wong KT (2010) Emerging epidemic viral encephalitides with a special focus on henipaviruses. *Acta Neuropathol* 120: 317-325.
8. Williamson MM, Torres-Velez FJ (2010) Henipavirus: a review of laboratory animal pathology. *Vet Pathol* 47: 871-880.
9. Drexler JF, Corman VM, Muller MA, Maganga GD, Vallo P, et al. (2012) Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* 3: 796.
10. Lam SK (2003) Nipah virus--a potential agent of bioterrorism? *Antiviral Res* 57: 113-119.
11. Xu K, Broder CC, Nikolov DB (2012) Ephrin-B2 and ephrin-B3 as functional henipavirus receptors. *Semin Cell Dev Biol* 23: 116-123.
12. McEachern JA, Bingham J, Crameri G, Green DJ, Hancock TJ, et al. (2008) A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* 26: 3842-3852.
13. Mungall BA, Middleton D, Crameri G, Bingham J, Halpin K, et al. (2006) Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol* 80: 12293-12302.
14. Pallister J, Middleton D, Wang LF, Klein R, Haining J, et al. (2011) A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine* 29: 5623-5630.
15. Bossart KN, Crameri G, Dimitrov AS, Mungall BA, Feng YR, et al. (2005) Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross-reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus. *J Virol* 79: 6690-6702.
16. Guillaume V, Contamin H, Loth P, Georges-Courbot MC, Lefevre A, et al. (2004) Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J Virol* 78: 834-840.
17. Weingartl HM, Berhane Y, Caswell JL, Loosmore S, Audonnet JC, et al. (2006) Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J Virol* 80: 7929-7938.
18. Chattopadhyay A, Rose JK (2011) Complementing defective viruses that express separate paramyxovirus glycoproteins provide a new vaccine vector approach. *J Virol* 85: 2004-2011.
19. Defang GN, Khetawat D, Broder CC, Quinnan GV, Jr. (2010) Induction of neutralizing antibodies to Hendra and Nipah glycoproteins using a Venezuelan equine encephalitis virus in vivo expression system. *Vaccine* 29: 212-220.
20. Daya S, Berns KI (2008) Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21: 583-593.
21. Mingozzi F, High KA (2011) Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* 12: 341-355.
22. Johnson PR, Schnepf BC, Connell MJ, Rohne D, Robinson S, et al. (2005) Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J Virol* 79: 955-965.
23. Xin KQ, Ooki T, Mizukami H, Hamajima K, Okudela K, et al. (2002) Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum Gene Ther* 13: 1571-1581.
24. Xin KQ, Urabe M, Yang J, Nomiya K, Mizukami H, et al. (2001) A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* 12: 1047-1061.
25. Lin J, Calcedo R, Vandenberghe LH, Bell P, Somanathan S, et al. (2009) A new genetic vaccine platform based on an adeno-associated virus isolated from a rhesus macaque. *J Virol*.

26. Lin J, Zhi Y, Mays L, Wilson JM (2007) Vaccines based on novel adeno-associated virus vectors elicit aberrant CD8+ T-cell responses in mice. *J Virol* 81: 11840-11849.
27. Lin SW, Hensley SE, Tatsis N, Lasaro MO, Ertl HC (2007) Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8+ T cells in mice. *J Clin Invest* 117: 3958-3970.
28. Sipo I, Knauf M, Fechner H, Poller W, Planz O, et al. (2011) Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* 29: 1690-1699.
29. Wong KT, Grosjean I, Brisson C, Blanquier B, Fevre-Montange M, et al. (2003) A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* 163: 2127-2137.
30. Xiao W, Chirmule N, Berta SC, McCullough B, Gao G, et al. (1999) Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* 73: 3994-4003.
31. Gao G, Alvira MR, Wang L, Calcedo R, Johnston J, et al. (2002) Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci USA* 99: 11854-11859.
32. Mays LE, Vandenbergh LH, Xiao R, Bell P, Nam HJ, et al. (2009) Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J Immunol* 182: 6051-6060.
33. Maeldansmo GM, Ross PJ, Pavliv M, Meulenbroek RA, Eveleigh C, et al. (2005) Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice. *J Gene Med* 7: 307-315.
34. McCarty DM, Fu H, Monahan PE, Toulson CE, Naik P, et al. (2003) Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* 10: 2112-2118.
35. Wang J, Xie J, Lu H, Chen L, Hauck B, et al. (2007) Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104: 13104-13109.
36. Guillaume V, Wong KT, Looi RY, Georges-Courbot MC, Barrot L, et al. (2009) Acute Hendra virus infection: Analysis of the pathogenesis and passive antibody protection in the hamster model. *Virology* 387: 459-465.
37. Broder CC (2012) Henipavirus outbreaks to antivirals: the current status of potential therapeutics. *Curr Opin Virol* 2: 176-187.
38. Bossart KN, Geisbert TW, Feldmann H, Zhu Z, Feldmann F, et al. (2011) A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. *Sci Transl Med* 3: 105ra103.
39. Bossart KN, Zhu Z, Middleton D, Klippel J, Crameri G, et al. (2009) A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection. *PLoS Pathog* 5: e1000642.
40. Zhu Z, Dimitrov AS, Bossart KN, Crameri G, Bishop KA, et al. (2006) Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. *J Virol* 80: 891-899.
41. High KA, Aubourg P (2011) rAAV human trial experience. *Methods Mol Biol* 807: 429-457.
42. Schnepf BC, Clark KR, Klemanski DL, Pacak CA, Johnson PR (2003) Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* 77: 3495-3504.
43. Penaud-Budloo M, Le Guiner C, Nowrouzi A, Toromanoff A, Cherel Y, et al. (2008) Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* 82: 7875-7885.
44. Nakai H, Yant SR, Storm TA, Fuess S, Meuse L, et al. (2001) Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* 75: 6969-6976.
45. Grimm D, Kay MA (2003) From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* 3: 281-304.
46. Ayuso E, Mingozzi F, Bosch F (2010) Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* 10: 423-436.
47. Kotin RM (2011) Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet* 20: R2-6.
48. Du L, He Y, Wang Y, Zhang H, Ma S, et al. (2006) Recombinant adeno-associated virus expressing the receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein elicits neutralizing antibodies: Implication for developing SARS vaccines. *Virology* 353: 6-16.
49. Liu DW, Chang JL, Tsao YP, Huang CW, Kuo SW, et al. (2005) Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int J Cancer* 113: 93-100.
50. Kuck D, Lau T, Leuchs B, Kern A, Müller M, et al. (2006) Intranasal vaccination with recombinant adeno-associated virus type 5 against human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* 80: 2621-2630.
51. McCarty DM, Monahan PE, Samulski RJ (2001) Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* 8: 1248-1254.
52. Bossart KN, Bingham J, Middleton D (2007) Targeted strategies for henipavirus therapeutics. *Open Virol J* 1: 14-25.

53. Logan GJ, Wang L, Zheng M, Cunningham SC, Coppel RL, et al. (2007) AAV vectors encoding malarial antigens stimulate antigen-specific immunity but do not protect from parasite infection. *Vaccine* 25: 1014-1022.
54. Chua KB, Bellini WJ, Rota PA, Harcourt BH, Tamin A, et al. (2000) Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* 288: 1432-1435.
55. Harcourt BH, Tamin A, Ksiazek TG, Rollin PE, Anderson LJ, et al. (2000) Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* 271: 334-349.
56. Zhu Z, Bossart KN, Bishop KA, Crameri G, Dimitrov AS, et al. (2008) Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody. *J Infect Dis* 197: 846-853.
57. Patterson CE, Lawrence DM, Echols LA, Rall GF (2002) Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J Virol* 76: 4497-4506.
58. Ota MO, Ndhlovu Z, Oh S, Piyasirisilp S, Berzofsky JA, et al. (2007) Hemagglutinin protein is a primary target of the measles virus-specific HLA-A2-restricted CD8+ T cell response during measles and after vaccination. *J Infect Dis* 195: 1799-1807.
59. Nieto K, Kern A, Leuchs B, Gissmann L, Muller M, et al. (2009) Combined prophylactic and therapeutic intranasal vaccination against human papillomavirus type-16 using different adeno-associated virus serotype vectors. *Antivir Ther* 14: 1125-1137.
60. Salvetti A, Or ve S, Chadeuf G, Favre D, Cherel Y, et al. (1998) Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum Gene Ther* 9: 695-706.
61. Xiao X, Li J, Samulski RJ (1998) Production of high-titer recombinant Adeno-Associated Virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J Virol* 72: 2224-2232.
62. Grimm D, Kay MA, Kleinschmidt JA (2003) Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol Ther* 7: 839-850.
63. Szecsi J, Boson B, Johnsson P, Dupeyrot-Lacas P, Matrosovich M, et al. (2006) Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Virol J* 3: 70.
64. Mathieu C, Pohl C, Szecsi J, Trajkovic-Bodennec S, Devergnas S, et al. (2011) Nipah Virus Uses Leukocytes for Efficient Dissemination within a Host. *J Virol* 85: 7863-7871.

Figures

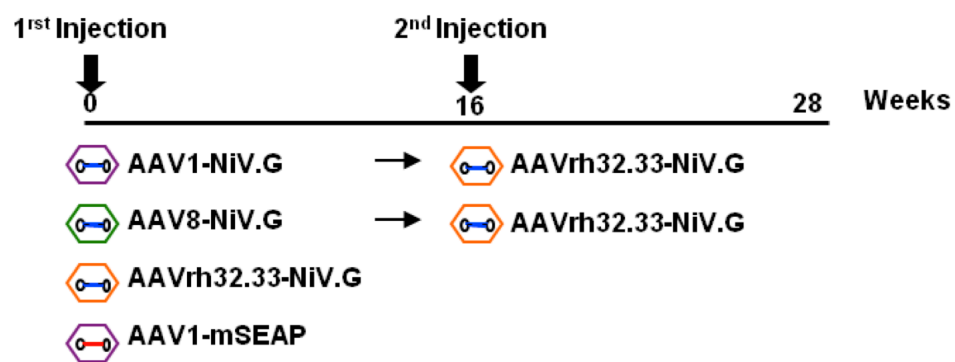


Figure 1. Schematic view of the vaccination protocol in mice

Three groups of Balb/c mice (n= 5) were primed either IM or ID with three different AAV vector serotypes encoding the NiV G protein (2×10^{10} and 1×10^{10} gp/animal for IM and ID injections, respectively). As a control, a fourth group was injected with an AAV1 vector encoding mSEAP. A boost injection was performed at week 16 with a heterologous AAVrh32.33 as indicated.

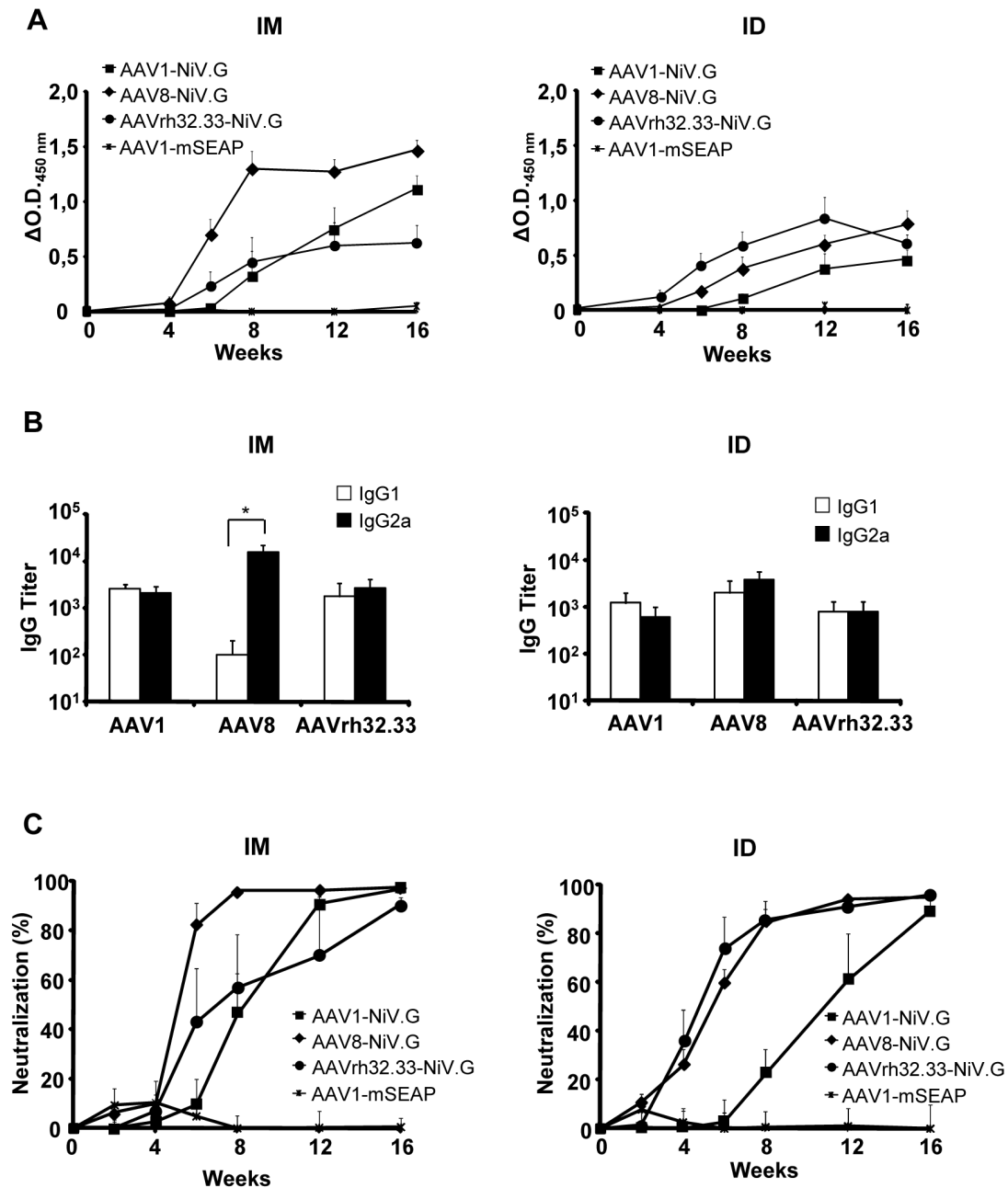


Figure 2. Follow-up of anti-NiV G humoral responses in AAV injected mice

A. Follow up of anti-NiV G protein IgG response by ELISA. Results are expressed as the mean $\Delta O.D._{450nm} \pm SEM$ (n=5). **B.** Measure of IgG isotype titers 16 weeks post-prime. The anti-NiV G IgG titers are expressed as the reciprocal value of the highest dilution that yields a $\Delta O.D._{450nm} > 0.2$. Data are presented as mean $\pm SEM$ (n=5). * $p < 0.05$. **C.** Follow up of anti-NiV NAb by a neutralization assay using NiV-VLPs (see Material and Methods). The results are expressed as the mean percent of neutralization $\pm SEM$ (n=5).

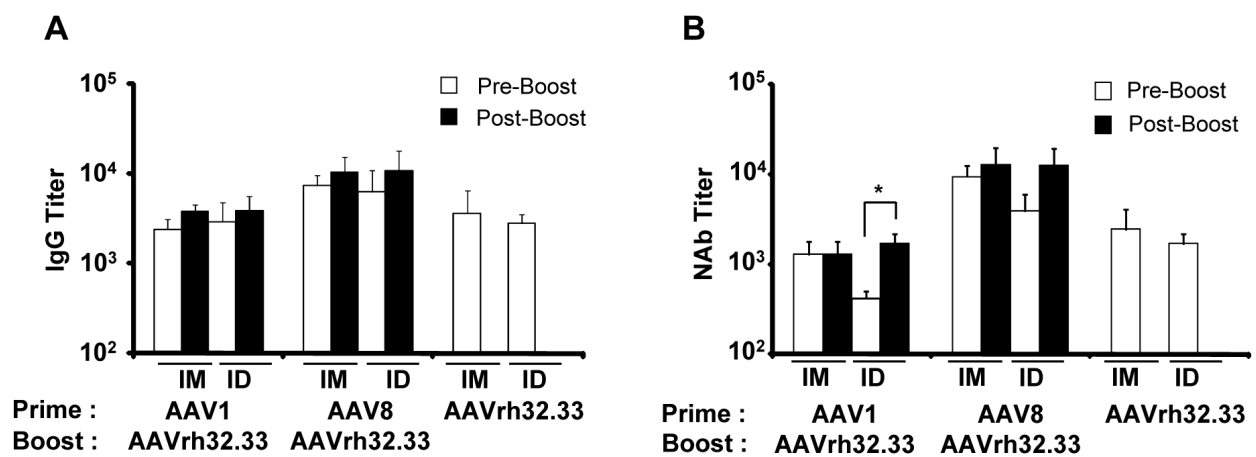


Figure 3. Effect of a boost vaccination on IgG and NAb titers

Animals primed with AAV1 and AAV8 vectors were boosted with AAVrh32.33-NiV.G particles injected in the contralateral muscle or ear (2×10^{10} and 1×10^{10} gp/animal for IM and ID injections, respectively). IgG (A) and NAb (B) titers were measured at 16 weeks after the prime (Pre-Boost) and 4 weeks after the boost (Post-Boost). The anti-NiV specific NAb titers were expressed as the reciprocal of the highest dilution that yields 50 % of neutralization \pm SEM (n=5). * $p < 0.05$.

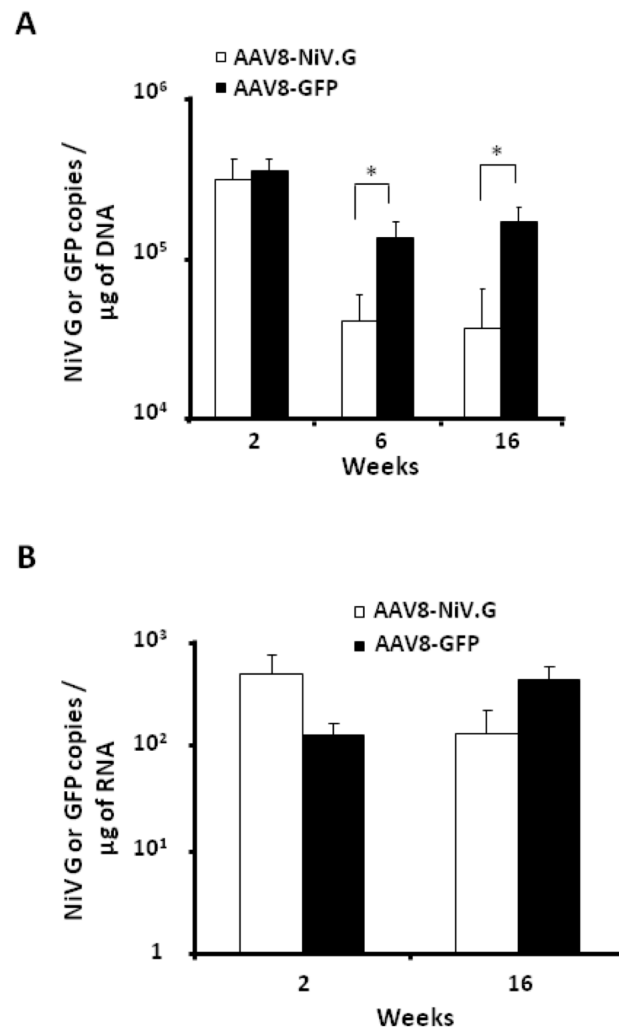


Figure 4. Analysis of AAV vector persistence and expression in murine muscle

Mice were injected IM with AAV8-NiV.G or AAV8-GFP (2×10^{10} gp/animal). Muscles were harvested at each indicated time point (n=5) and used for DNA and RNA extraction. AAV vector persistence (**A**) was measured by qPCR using primers hybridizing to the NiV G or GFP DNA. AAV vector expression (**B**) was measured by RT-qPCR using primers hybridizing to the NiV G or the GFP cDNAs. Results are expressed as the mean \pm SEM of the number of NiV G DNA and RNA copies per μ g of DNA and RNA, respectively (n=5). * $p < 0.05$.

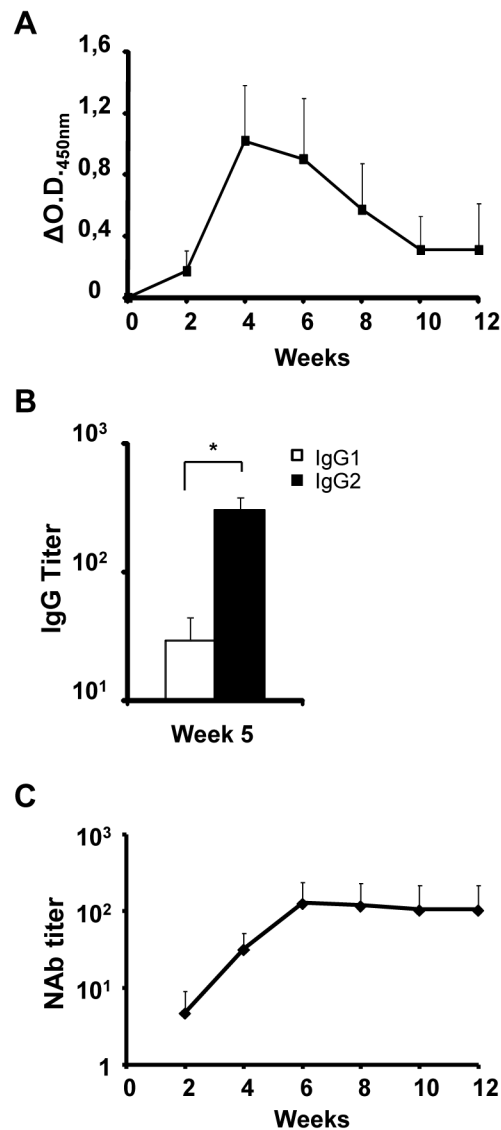


Figure 5. AAV-NiV.G vaccination in golden hamsters

A. Follow up of anti-NiV G IgG response by ELISA. Results are expressed as the mean $\Delta O.D._{450 nm} \pm SEM$ (n=5). **B.** Anti-NiV G IgG isotype titers measured at 5 weeks p.i. The IgG titers are expressed as the reciprocal of the highest dilution that yield a $\Delta O.D._{450 nm} > 0.2 \pm SEM$ (n=5). * $p < 0.05$. **C.** Follow up of anti-NiV NAb titers by neutralization assays using NiV-VLPs (see Material and Methods). Results are expressed as the reverse of the highest dilution that yields 50 % of neutralization $\pm SEM$ (n=5).

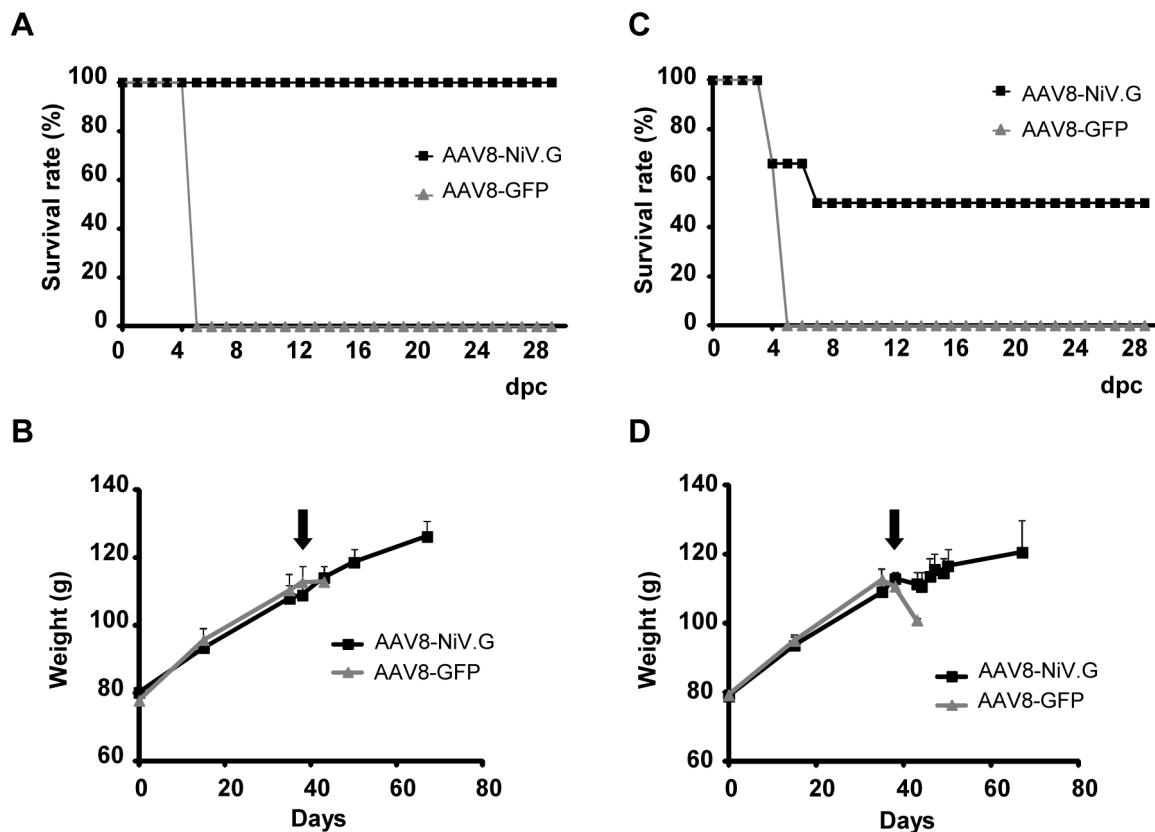


Figure 6. Challenge with Henipaviruses in vaccinated hamster

Survival rates in vaccinated and control hamsters during 29 days post-challenge (dpc) with NiV (A) or HeV (C). Results are expressed as the percentage of animals (n=6 per group) which survived over time. (B) and (D) Weight curve of vaccinated and control hamster before and after challenge with Henipaviruses. Animals (n=6 per group) were weighted before (until day 38) and after the challenge with NiV (B) or HeV (D). The black arrows indicate the day of challenge. Animals that lost more than 20 % of their mass were euthanized.

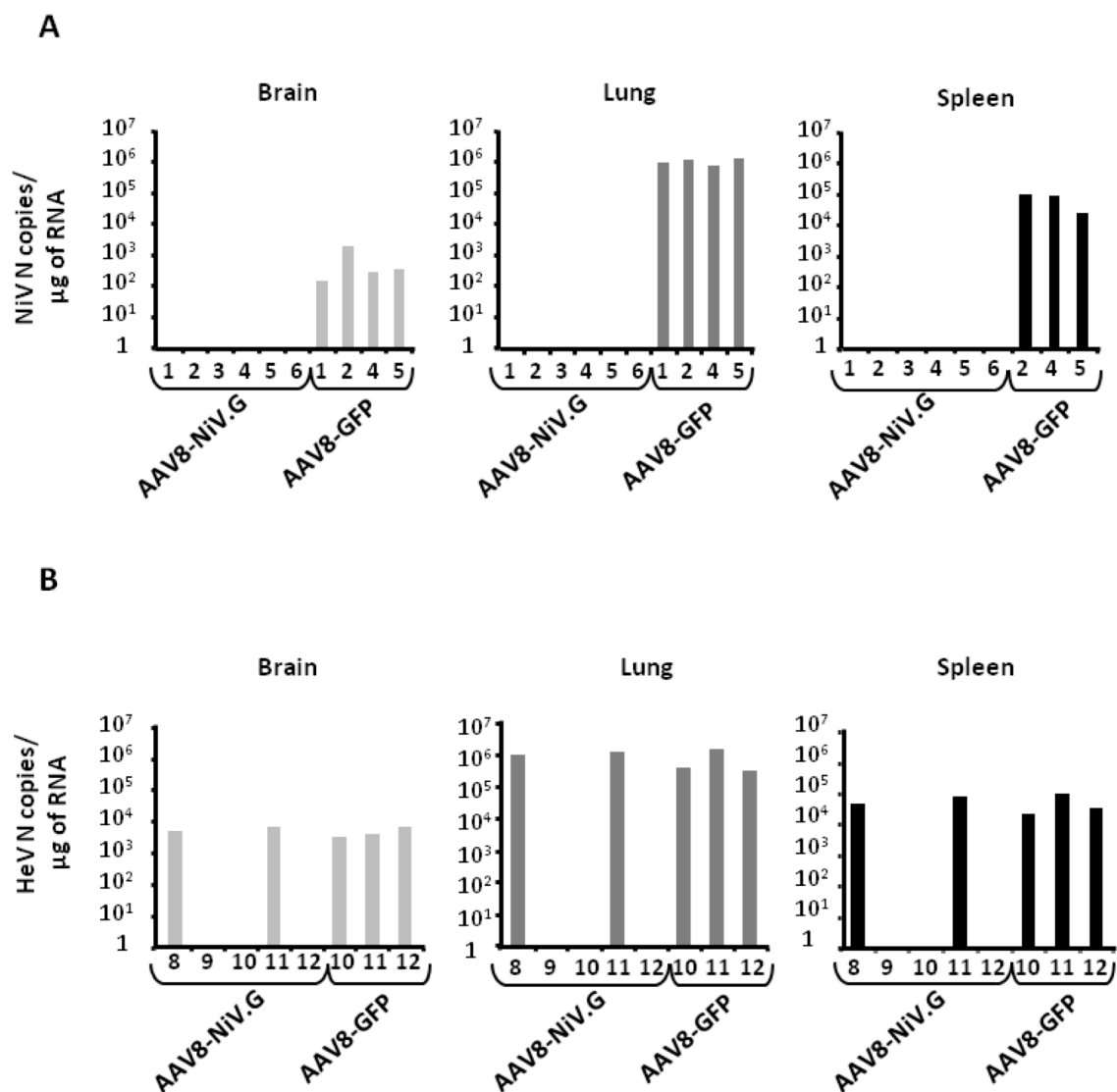


Figure 7. Detection of Henipavirus RNA in tissues from immunized and control animals

Brain, lung and spleen were collected from animals at the time of euthanasia (see Table 1 and 2 for details). RNA was extracted and analysed by RT-qPCR using primers hybridizing either to NiV (A) or HeV (B) N gene. The same results were obtained using primers hybridizing to the G gene (data not shown). Results are expressed as the relative number of NiV and HeV RNA copies per µg of RNA.

Tables

Table 1. NAb titers against NiV, and NiV RNA detection in vaccinated and control hamsters challenged with NiV

Animal ID-#	Euth/ Death	Pre-Ch NAb	Post-Ch NAb				Viral RNA		
			dpc-1	dpc 5	dpc 12	dpc 29	Sp	Lg	Br
NiV.G-1	29	1:40	1:80	1:80	1:60		-	-	-
NiV.G-2	29	1:160	1:160	1:120	1:160		-	-	-
NiV.G-3	29	<1:10	1:10	1:10	1:10		-	-	-
NiV.G-4	29	1:120	1:80	1:80	1:160		-	-	-
NiV.G-5	29	<1:10	<1:10	1:40	1:240		-	-	-
NiV.G-6	29	<1:10	1:20	1:20	1:20		-	-	-
GFP-1	5	<1:10	<1:10	nd	nd		nd	+	+
GFP-2	5	<1:10	<1:10	nd	nd		+	+	+
GFP-3	5 [†]	<1:10	nd	nd	nd		nd	nd	nd
GFP-4	5	<1:10	<1:10	nd	nd		+	+	+
GFP-5	5	<1:10	<1:10	nd	nd		+	+	+
GFP-6	5 [†]	<1:10	nd	nd	nd		nd	nd	nd

Vaccinated and control animals were euthanized at indicated days post-challenge (dpc) unless otherwise indicated. Anti-NiV NAb titers were quantified before challenge and at indicated dpc using a seroneutralization assay against NiV in the BSL4 laboratory. Viral RNA was detected by RT-qPCR in indicated organs. Sp: spleen; Lg: lungs; Br: brain. †: animal found dead; nd: not done.

Table 2. NAb titers against HeV, and HeV RNA detection in vaccinated and control hamsters challenged with HeV

Animal ID-#	Euth/ Death	Pre-Ch NAb	Post-Ch NAb				Viral RNA		
			dpc-1	dpc 5	dpc 12	dpc 29	Sp	Lg	Br
NiV.G-7	7 [†]	<1:10	<1:10	nd	nd	nd	nd	nd	nd
NiV.G-8	4	<1:10	<1:10	nd	nd	+	+	+	+
NiV.G-9	29	<1:10	1:20	1:640	1:960	-	-	-	-
NiV.G-10	29	<1:10	1:40	<1:10	<1:10	-	-	-	-
NiV.G-11	4	<1:10	<1:10	nd	nd	+	+	+	+
NiV.G-12	29	<1:10	1:10	<1:10	<1:10	-	-	-	-
GFP-7	5 [†]	<1:10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GFP-8	4 [†]	<1:10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GFP-9	5 [†]	<1:10	nd	nd	nd	nd	nd	nd	nd
GFP-10	5	<1:10	<1:10	nd	nd	+	+	+	+
GFP-11	4	<1:10	<1:10	nd	nd	+	+	+	+
GFP-12	5	<1:10	<1:10	nd	nd	+	+	+	+

Vaccinated and control animals were euthanized at indicated days post-challenge (dpc) unless otherwise indicated. Anti-HeV NAb titers were quantified before challenge and at indicated dpc using a seroneutralization assay against HeV in the BSL4 laboratory. Viral RNA was detected by RT-qPCR in indicated organs. Sp: spleen; Lg: lungs; Br: brain. †: animal found dead; nd: not done.

Supporting information

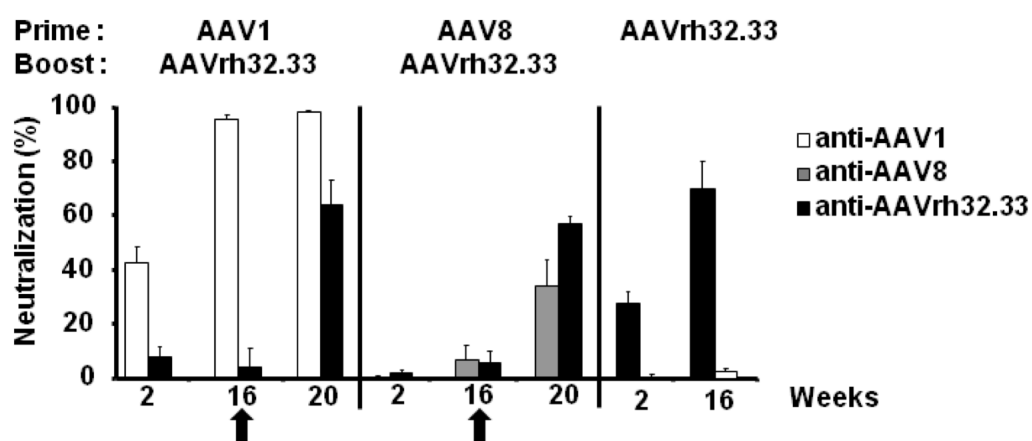


Figure S1. Detection of anti-AAV NAb

Neutralizing antibodies against AAV capsids were measured from sera of mice collected at different times after IM injection of AAV-NiV.G vectors as indicated in the Material and Methods section. Results below 20 % of neutralization are considered as non-relevant. The data are presented as mean of the percentage of neutralization \pm SEM (n=5). Black arrows indicated the boost with AAVrh32.33-NiV.G vector at week 16.

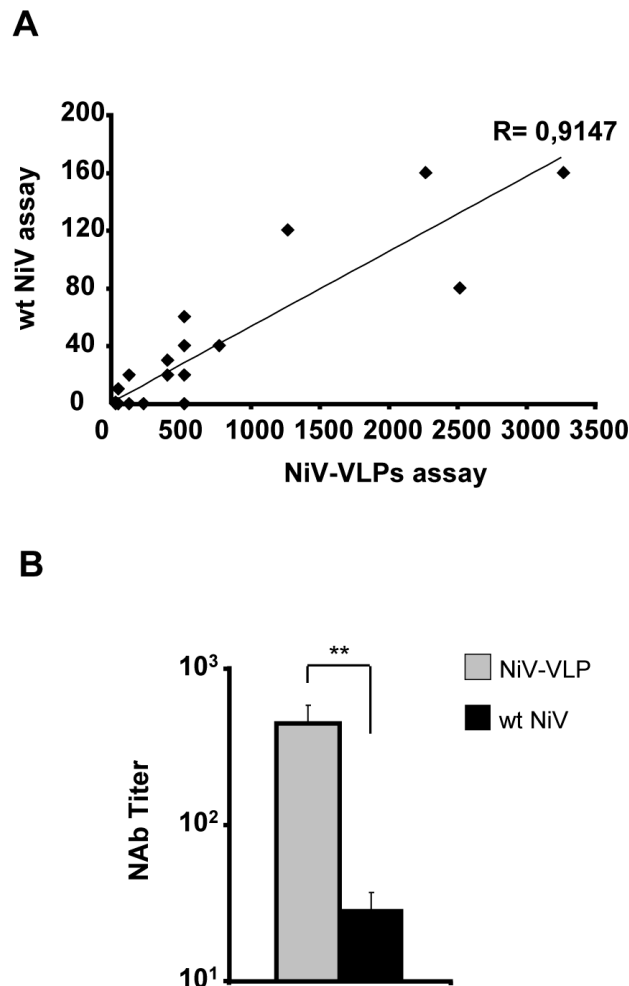


Figure S2. Comparison of anti-NiV neutralization assays

A. 33 samples of sera from vaccinated hamsters were analysed for the presence of anti-NiV NAb by a neutralization assay using either NiV-VLPs or wt NiV. The titers obtained using the first assay indicate the reciprocal of the serum dilution resulting in 50 % of neutralization whereas those obtained using the second assay represent the reciprocal of the last dilution which completely inhibited the cytopathic effect of NiV. R indicates the value for the Pearson's correlation coefficient. **B.** Comparison of the mean of NAb titers obtained with both techniques (n=33). The mean value \pm SEM is expressed as indicated above. ** $p < 0.01$.

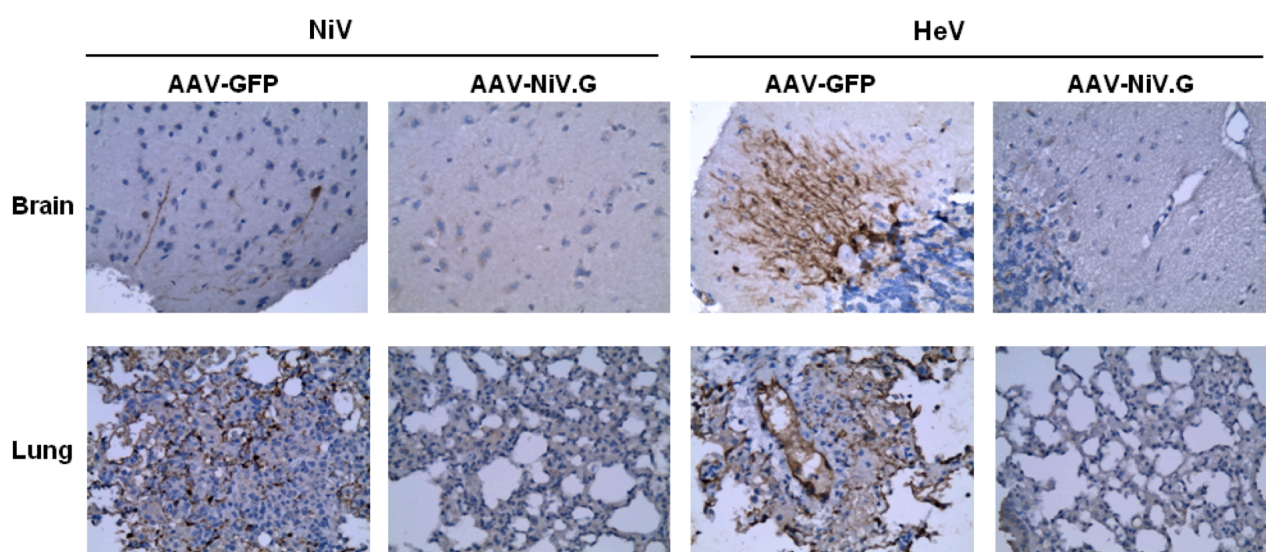


Figure S3. Detection of Henipavirus antigens in tissues from vaccinated and control animals

Brain and lung tissues sections from vaccinated animals, challenged with either NiV or HeV were fixed and analysed by immunohistochemistry using an anti-HeV polyclonal Ab as described in ref. (36). Viral antigens are detected by HRP staining. Arrows indicate positive cells.

2.2 ÉTUDES COMPLÉMENTAIRES DANS LE MODÈLE SOURIS

2.2.1 Analyses des réponses anticorps neutralisantes dirigées contre les capsides d'AAV

Une des hypothèses pouvant expliquer l'absence d'augmentation significative des réponses humores après la 2^{ème} injection, est l'apparition d'anticorps anti-capside d'AAV au pouvoir cross-neutralisant. En effet, la première injection de vecteurs AAV ayant induit des réponses AcN contre la capside virale du sérotype utilisé, ces AcN ont peut-être neutralisé le second sérotype d'AAV utilisé lors de la 2^{ème} injection.

Afin de vérifier cette hypothèse, les AcN anti-capside d'AAV ont été mesurés avant et après la seconde injection de vecteurs AAV. Les sérums des souris immunisées par l'AAV1, l'AAV8 ou l'AAVrh32.33 ont été incubés avec différentes particules d'AAV de sérotype 1, 8 ou rh32.33 codant pour la GFP.

En présence d'anticorps neutralisants spécifiques d'une capside d'AAV, les particules d'AAV-GFP sont neutralisées et ne peuvent pas infecter les cellules cibles. Dans le cas contraire, les particules peuvent transduire les cellules cibles et la protéine GFP est alors exprimée (principe du test identique à celui présenté dans Résultats, Chapitre 1.3). La mesure du pourcentage de cellules GFP+ par cytométrie en flux, permet de déterminer le pourcentage d'inhibition induit par le sérum testé.

Comme attendu, l'administration de vecteurs AAV1 a induit le développement d'anticorps anti-capside spécifiques du sérotype 1 et ce, indépendamment de la voie d'injection utilisée (Figure 41).

En revanche, ces anticorps ont été incapables de neutraliser les capsides d'AAVrh32.33 utilisées lors de la seconde injection. Les mêmes résultats ont été obtenus après injection des vecteurs AAV8 ou AAVrh32.33. Les anticorps anti-capside produits sont spécifiques du sérotype d'AAV injecté et sont incapables de cross-neutraliser le 2^{ème} sérotype utilisé. La détection des anticorps spécifiques du sérotype 8 s'est avérée très faible et aurait nécessité davantage de mises au point.

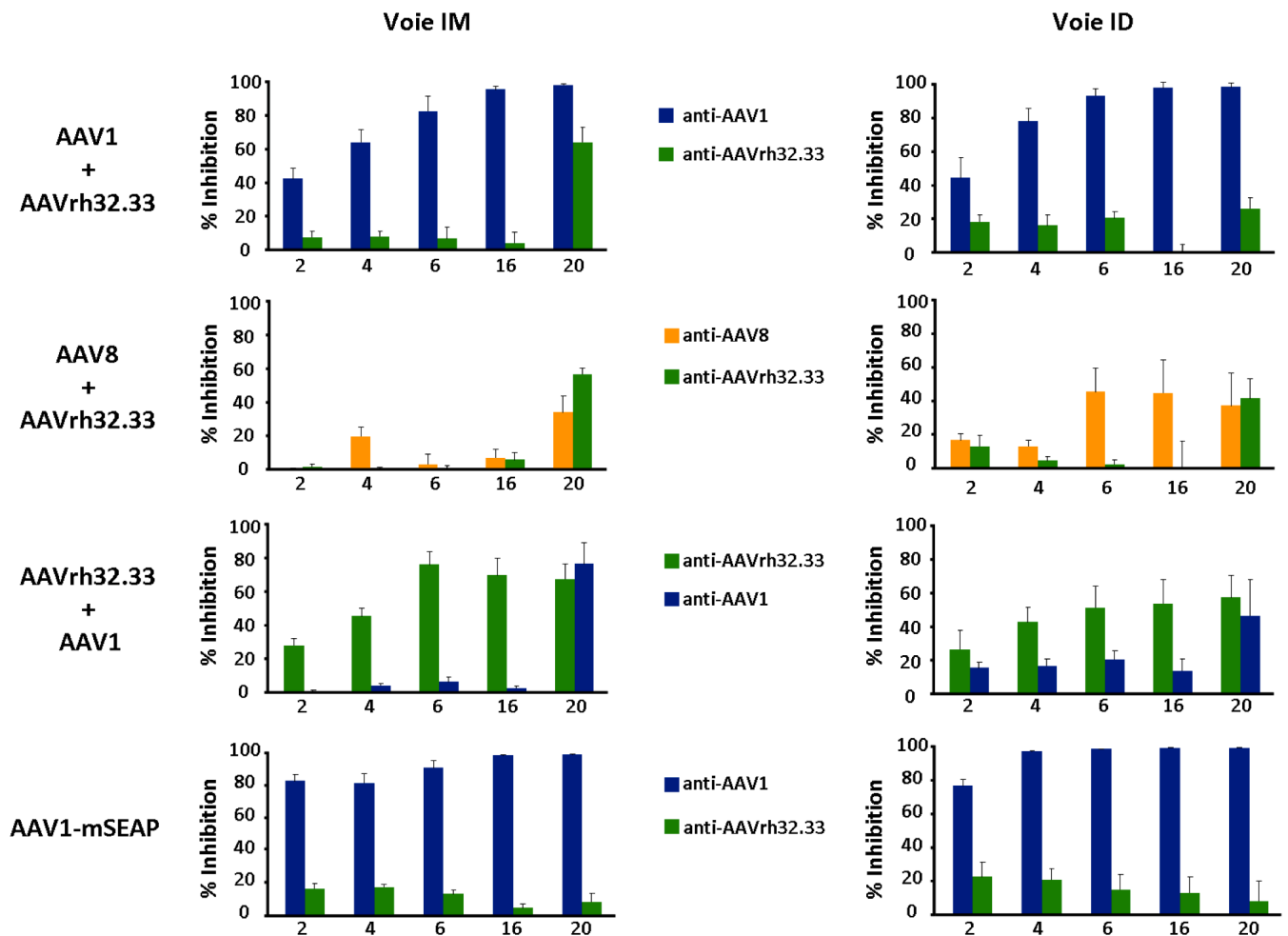


Figure 41. Anticorps neutralisants anti-capside d'AAV et cross-neutralisation

Les sérums de souris immunisées (n=5) par les différents vecteurs AAV ont été évalués pour leur capacité à neutraliser des particules d'AAV-GFP de différents sérotypes (AAV1, AAV8 et AAVrh32.33). L'axe des abscisses représente les semaines suivant la première injection de vecteur et les deux voies d'injections sont représentées (IM et ID). La seconde injection de vecteurs AAV a été réalisée à la semaine 16. Un pourcentage d'inhibition inférieur à 20 % est considéré comme un signal non spécifique.

2.2.2 Développement d'un vecteur Adénoviral codant pour la protéine Niv G

Nos analyses de la réponse humorale se sont focalisées sur la comparaison de divers sérotypes d'AAV et de deux voies d'injection. Cependant, il est apparu très rapidement que ces analyses pouvaient être ultérieurement développées en comparant les vecteurs AAV à d'autres formes de vaccination, notamment celles reposant sur l'utilisation de vecteurs Ad. En effet, l'Ad, est un vecteur très immunogène largement utilisé en vaccination. Il induit dès son injection de fortes réponses immunitaires innées provoquant une inflammation et une destruction rapide des cellules infectées (Dai *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994a). Cette partie

décrit la construction et l'analyse de ce vecteur et les études de comparaisons préliminaires que nous avons conduites à ce sujet et qui n'ont pas été incluses dans la publication.

2.2.2.1 Construction d'un Adénovirus codant pour la protéine G du virus Nipah

Pour faciliter la détection de la protéine NiV G, nous avons voulu dans un premier temps fusionner sa séquence avec celle codant pour une étiquette Flag. Pour cela, la séquence codante NiV G a été fusionnée à une séquence codant pour une étiquette Flag en position N-term (côté cytoplasmique) ou C-term (côté extracellulaire) de la protéine G (Figure 42A). Afin de s'assurer que ces étiquettes n'ont pas modifié la protéine G et n'ont pas empêché son repliement correct, sa localisation et sa fonctionnalité ont été vérifiées par WB et IF. Les plasmides phCMV-NiV.G-Flag portant l'étiquette en position N-term ou C-term ont été transfectés dans des cellules 293SZ. Une construction codant pour la protéine Rep du virus AAV portant l'étiquette Flag a été utilisée comme contrôle positif. Deux jours plus tard, les lysats cellulaires ont été analysés par WB en utilisant un anticorps spécifique de l'étiquette Flag (F1804, Sigma) pour visualiser la présence de la protéine G marquée (Figure 42B). Comme attendu, le contrôle positif (Ctrl+) code pour deux protéines Rep78 et Rep68 du virus AAV possédant le marqueur Flag. Leurs tailles sont d'environ 78 et 68 kDa respectivement. Les deux protéines NiV.G-Flag N-term ou C-term montrent une taille identique d'environ 77 kDa correspondant aux prédictions. La présence de bandes supplémentaires d'une taille inférieure à 70 kDa et leur absence dans les contrôles négatifs et positifs, indiquent une dégradation des protéines G-Flag. Cette expérience a montré que la protéine G possédant une étiquette Flag en position N-term ou C-term a été correctement produite après transfection *in vitro*.

La localisation membranaire de ces deux protéines a été ensuite vérifiée par IF. Des cellules 293SZ ont été transfectées par les plasmides codant pour la protéine G marquée ou un plasmide codant pour la protéine GFP (peGFPN1). Une IF utilisant l'anticorps spécifique de l'étiquette Flag a été réalisée (Figure 42C). Pour pouvoir détecter l'étiquette en position N-term de la protéine dont la localisation est intracellulaire, cette IF a été réalisée après perméabilisation des cellules. Comme attendu, la protéine GFP utilisée ici comme contrôle de transfection, possède une localisation cytoplasmique. Les protéines G marquées en position N-term ou C-term ont une localisation membranaire. En conclusion, l'étiquette Flag n'a pas empêché la maturation et la localisation membranaire de la protéine NiV G.

La cassette d'expression portant l'étiquette Flag en position C-term (extracellulaire) a été ensuite introduite dans le plasmide Adénoviral nommé « pshuttle » permettant la production de vecteurs Ad recombinants. Une deuxième insertion a été réalisée dans le plasmide « pshuttle-GFP » portant le gène *gfp*. Des cellules 293SZ ont été transfectées

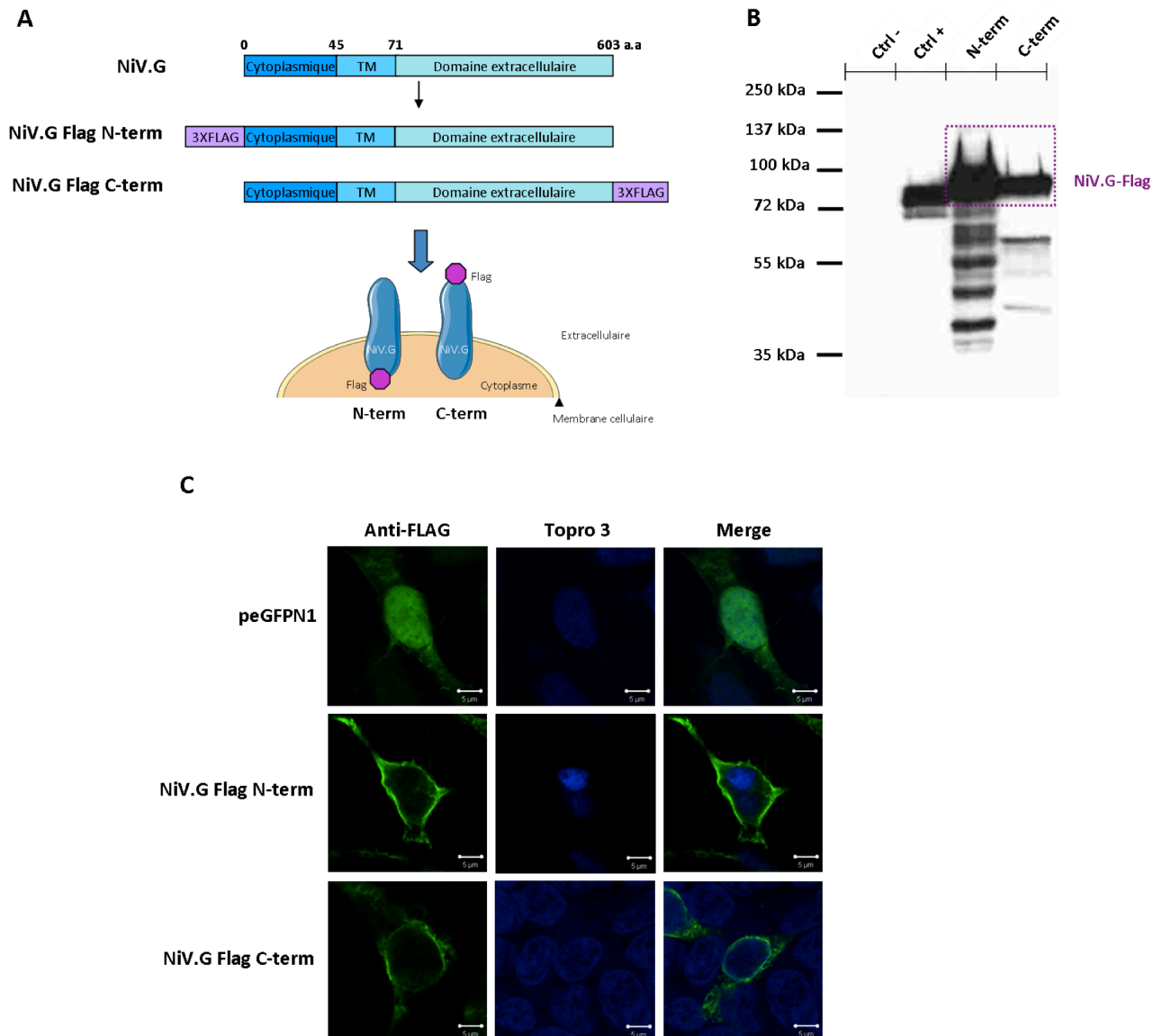


Figure 42. Développement et caractérisation d'une protéine G Flag

A. Schémas des constructions réalisées. Une étiquette Flag (3xFlag) a été insérée en position N-term (partie cytoplasmique) ou C-term (partie extracellulaire) de la protéine G du virus Nipah. **B. Production des protéines G-Flag.** Des cellules 293SZ ont été transfectées par 2 μ g de plasmide pHCMV-NiV.G Flag N-term ou C-term ou le plasmide pAAVFR codant pour la protéine Rep-Flag (Ctrl+). Les extraits protéiques ont été analysés par Western Blot utilisant un anticorps anti-Flag dilué au 1/1000 (F1804, Sigma) puis un anticorps secondaire anti-souris couplé à l'HRP. **C. Localisation membranaire des protéines G-Flag.** Des cellules 293SZ ont été transfectées par le plasmide pHCMV-NiV.G Flag N-term ou C-term ou le plasmide peGFPN1 codant pour la GFP. Les cellules ont été fixées, perméabilisées puis incubées avec un anticorps anti-Flag dilué au 1/1000 (F1804, Sigma). Un anticorps secondaire couplé à un fluorochrome Alexa488 (vert) a été utilisé au 1/2000. Le Topro3 dilué au 1/5000 permet de colorer le noyau des cellules en bleu. Les cellules ont ensuite été analysées par microscopie confocale. La barre blanche en bas à droite représente 5 μ m.

par les deux constructions pshuttle et pshuttle-GFP portant la cassette d'expression G-Flag (Figure 43A). Les extraits cellulaires ont été analysés 48 h plus tard par WB et les résultats ont confirmé l'expression de la protéine G-Flag C-term d'une taille de 77 kDa. Une transfection de cellules HeLa a donné les mêmes résultats (données non montrées). La fonctionnalité de ces protéines a été vérifiée par un test de fusion cellulaire (Figure 43B).

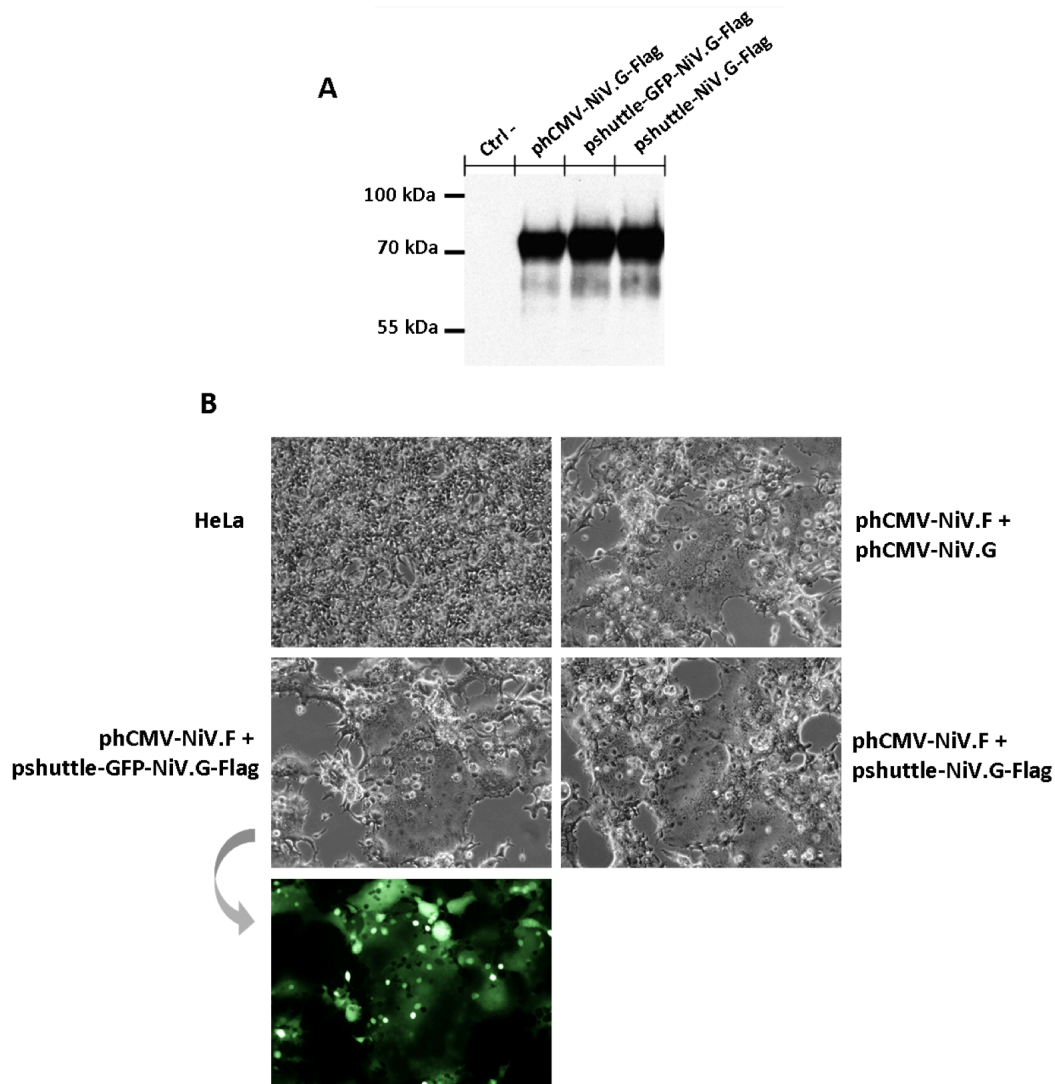


Figure 43. Caractérisation du plasmide Adénoviral codant pour la protéine G-Flag.

A. Des cellules 293SZ ont été transfectées par les plasmides pshuttle-GFP-NiV.G-Flag, pshuttle-NiV.G-Flag ou phCMV-NiV.G-Flag. Le contrôle négatif (Ctrl-) représente des cellules non transfectées. 48 h plus tard, les extraits protéiques ont été analysés par WB avec l'anticorps anti-Flag au 1/1000. **B.** Test de fusion. Des cellules HeLa ont été co-transfectées par le plasmide phCMV-NiV.F avec les plasmides pshuttle-GFP-NiV.G-Flag, pshuttle-NiV.G-Flag ou phCMV-NiV.G-Flag. 48 h plus tard des cellules multinuclées (syncytia) sont observées. Pour le plasmide pshuttle-GFP-NiV.G-Flag, la protéine GFP est également bien produite et visualisée par microscopie à fluorescence.

Comme expliqué précédemment, des cellules HeLa ont été co-transfectées par le plasmide phCMV-NiV.F associé au plasmide pshuttle-NiV.G-Flag, au pshuttle-GFP-NiV.G-Flag, ou au plasmide phCMV-NiV.G-Flag utilisé comme contrôle positif. La protéine G portant l'étiquette Flag en C-term exprimée par les deux plasmides Adénoviraux est fonctionnelle car des syncytia ont été visualisés 48 h après transfection. De plus, la protéine GFP provenant du plasmide pshuttle-GFP a également été produite et visualisée. Ces expériences ont démontré que la protéine G-Flag est bien capable de se fixer à son récepteur cellulaire EphrinB2.

2.2.2.2 Comparaison des réponses humorales induites par un AAV-NiV.G et un Ad-NiV.G

Des particules adénovirales de sérotype 5 ont été produites en utilisant le plasmide Adénoviral pshuttle-NiV.G-Flag, par la plateforme de production de vecteurs viraux à Nantes. Une comparaison avec les vecteurs AAV a été conduite sur des souris Balb/c (n=5 par groupe) injectées par voie IM avec le vecteur AAV8-NiV.G (2.10^{10} gp), AAV8-GFP (2.10^{10} gp) ou le vecteur Ad-NiV.G-Flag (1.10^9 pi). Le développement des réponses humorales a été suivi pendant 16 semaines (Figure 44A).

Comme vu précédemment, les IgG spécifiques de la protéine G sont apparues entre les semaines 4 et 6 pour l'AAV8-NiV.G et ont atteint un plateau vers la semaine 10. Comme attendu, le vecteur Ad-NiV.G-Flag a permis le développement d'une réponse IgG plus rapide dès la 2^{ème} semaine après injection, réponse qui devient relativement stable à partir de la semaine 6. Cependant, à partir de la semaine 10, la réponse IgG de ce vecteur a atteint un seuil similaire à celui observé avec le vecteur AAV-NiV.G.

Le titre en isotypes d'IgG a été ensuite évalué par ELISA 4 mois après injection (Figure 44B). De manière très intéressante, que ce soit pour l'AAV8-NiV.G ou pour l'Ad-NiV.G-Flag, le titre en IgG2a a été plus important que le titre en IgG1 ce qui indique qu'une orientation de la réponse immunitaire de type Th1 semble avoir lieu après injection de ces deux vecteurs chez la souris.

Afin d'approfondir la comparaison entre ces deux vecteurs, une titration des AcN spécifiques de la protéine G a été réalisée par le test de séroneutralisation VLP (Figure 44C). Les sérums des animaux immunisés ont été analysés au temps 2, 6 et 16 semaines après infection. Une corrélation parfaite entre les réponses IgG et AcN a été observée. En effet, dès la semaine 2, seul le vecteur Adénoviral a induit le développement d'AcN. Pour le vecteur AAV8-NiV.G, les AcN apparaissent à la semaine 6. En revanche, les titres en AcN spécifiques de la protéine G sont identiques pour les deux vecteurs 4 mois après injection.

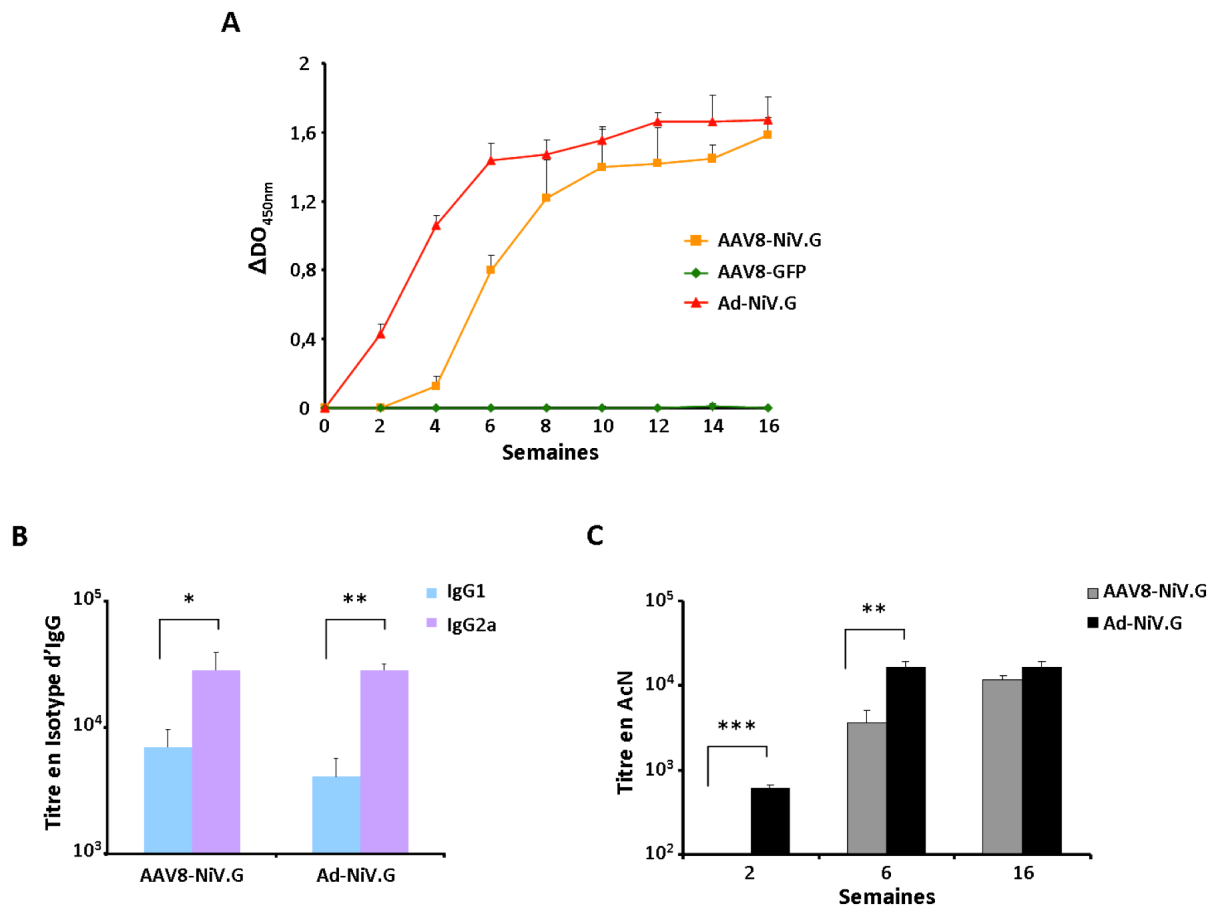


Figure 44. Comparaison des réponses humores induites par les vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G

Des souris Balb/c (n=5) ont été injectées IM par l'AAV8-NiV.G (2.10^{10} gp), l'AAV8-GFP (2.10^{10} gp) ou l'Ad-NiV.G (1.10^9 pi). Les sérums des animaux ont été prélevés tous les 15 jours et analysés. **A. Apparition des IgG spécifiques de la protéine G au cours du temps.** ELISA réalisé avec des sérums dilués au 1/200. **B. Titration des isotypes d'IgG par ELISA 4 mois après injection des vecteurs.** Titre représentant la dernière dilution de sérum permettant l'obtention d'un $\Delta DO < 0,2$. **C. Titration des AcN par test de séroneutralisation VLP aux temps 2, 6 et 16 semaines après immunisation.** Titre représentant la dernière dilution de sérum permettant d'obtenir 50 % d'inhibition du signal initial. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ et *** $p < 0,001$

Le vecteur Adénoviral a induit une réponse humorale plus rapide que le vecteur AAV. Ce phénomène est cohérent avec la littérature et avec la biologie de ces vecteurs. De plus, la réponse humorale observée pour le vecteur AAV8 est identique à celle observée dans la précédente expérience animale (voir Résultats, A.Ploquin *et al.*). Quatre mois après injection, les réponses humores dirigées contre la protéine G et induites par ces 2 vecteurs sont identiques tant au niveau de l'isotype d'IgG produit qu'au niveau du titre en AcN obtenu.

2.2.2.3 Etude de la persistance des vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G chez la souris

Après avoir vérifié la fonctionnalité ainsi que les réponses humérales induites, la persistance de ces vecteurs dans le temps a ensuite été évaluée. Pour cela, les muscles des groupes de 5 souris ont été prélevés à différents temps après injection des deux types de vecteurs par voie IM. La présence de l'ADN et de l'ARN de ces vecteurs dans le muscle a été évaluée par qPCR en ciblant une partie de la séquence d'ADN génomique ou complémentaire de la protéine GFP ou de la protéine NiV.G (Figure 45).

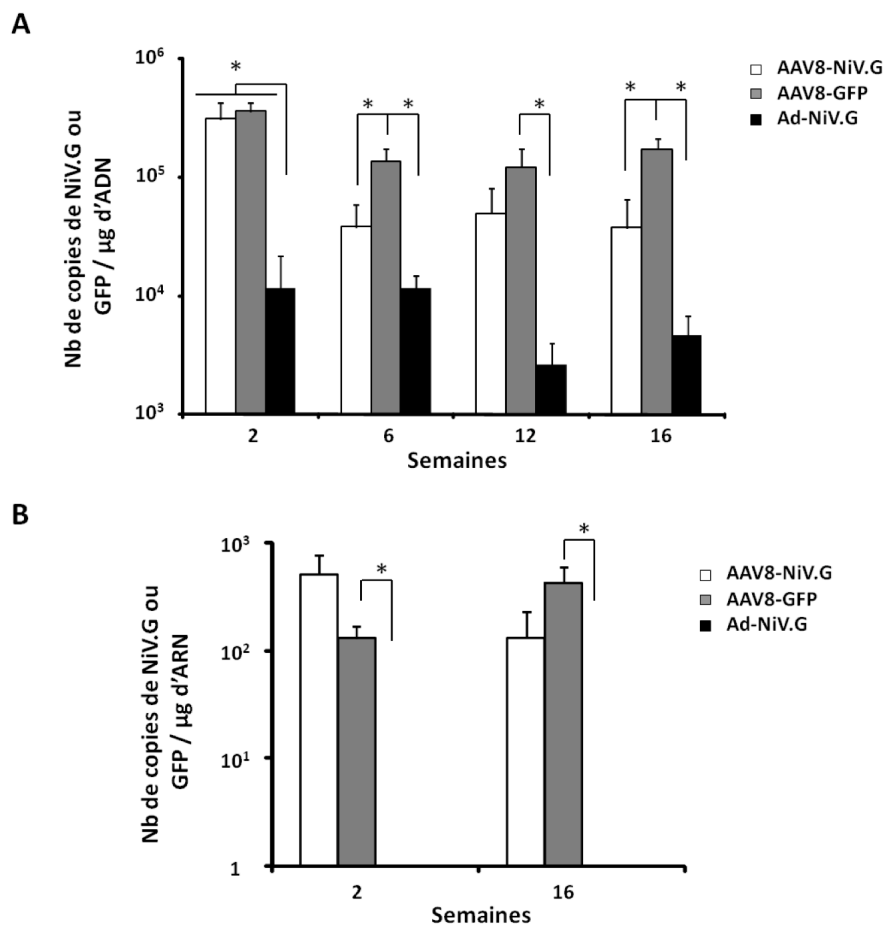


Figure 45. Persistance des vecteurs AAV-NiV.G et Ad-NiV.G dans le temps

Des souris (n=5) ont été injectées avec les vecteurs AAV8-NiV.G ou -GFP ($2 \cdot 10^{10}$ gp) ou l'Ad-NiV.G ($1 \cdot 10^9$ pi). Les muscles injectés ont été prélevés à différent temps. **A.** La persistance des vecteurs a été mesurée par analyse de l'ADN par qPCR avec des amorces spécifiques de la séquence NiV.G ou GFP. **B.** L'expression des vecteurs a été mesurée par analyse de l'ARN par RT-qPCR avec des amorces spécifiques des ADN complémentaires de NiV.G ou GFP. Les résultats sont représentés en nombre copies du gène d'intérêt, normalisé par le gène de ménage et ramené à la quantité en µg. * $p < 0,05$

Par rapport aux résultats obtenus avec les vecteurs AAV, déjà décrits dans le paragraphe précédent, une plus faible quantité d'ADN du vecteur Ad-NiV.G a été détectée

dès 15 jours après injection et cette quantité a diminué au cours du temps pour atteindre un niveau très faible dès la semaine 12 et significativement différent de celui observé avec les deux vecteurs AAV.

Des résultats similaires ont été obtenus avec des amorces reconnaissant une partie du promoteur CMV présent dans les 3 vecteurs (donnés non montrées). L'analyse de la quantité d'ARN correspondant au transgène véhiculé par ces vecteurs indique un très faible niveau d'expression du vecteur Ad-NiV.G à la semaine 2 et à la semaine 16 (données à la limite de la détection > 30Ct) (Figure 45B).

Ces résultats indiquent que contrairement aux vecteurs AAV-NiV.G dont l'ADN et l'ARN sont encore présents à un niveau significatif 16 semaines après injection, dans le cas du vecteur Ad-NiV.G, une disparition progressive de l'ADN et l'ARN est observée. Ceci suggère l'apparition d'une réponse cellulaire forte contre la protéine G conduisant à l'élimination de la majorité des cellules transduites. Ces données comparant la persistance dans le temps du vecteur AAV8-NiV.G à un vecteur contrôle AAV8-GFP et à un vecteur très immunogène l'Ad-NiV.G complètent les résultats présentés dans la publication A.Ploquin *et al.*

2.2.3 Comparaison des réponses humorales induites par la protéine NiV G membranaire ou soluble

L'injection du vecteur AAV8-NiV.G chez la souris induit l'apparition d'anticorps spécifiques de la protéine G entre les semaines 4 et 6. Ce délai est en partie expliqué par le temps nécessaire aux vecteurs AAV sb pour être convertis en une forme double brin, puis être transcrits. En général, cette étape requiert au minimum une durée de 2 semaines *in vivo*.

Un des facteurs pouvant influencer la vitesse d'apparition des réponses humorales est la nature de l'antigène. En effet, il a été montré qu'un antigène sécrété permet le développement d'une réponse humorale plus rapide et plus forte qu'un antigène membranaire (Drew, Lightowlers, and Strugnell, 2000). Le développement d'une construction codant pour la protéine Gs nous fournissait une opportunité unique de tester cette hypothèse.

2.2.3.1 Développement des vecteurs AAV-NiV.Gs

La cassette d'expression du plasmide phCMV-NiV.Gs, utilisé pour le développement du test ELISA, a été insérée dans le vecteur AAV SSV9 (voir Résultats, Chapitre 1.2.1). Des

particules d'AAV de sérotype 1, 8 et rh32.33 codant pour la protéine Gs ont été produites et leur fonctionnalité a été vérifiée *in vitro* (Figure 46). Des cellules 293SZ ont été transfectées par le plasmide pDG portant les fonctions auxiliaires permettant de stimuler la transduction des vecteurs AAV, puis infectées par les vecteurs AAV-NiV.Gs. Après 48 h, les surnageants cellulaires ont été récoltés et la présence de la protéine Gs a été évaluée par WB et ELISA (Figure 46A et B). Les vecteurs AAV-NiV.Gs ont permis la production d'une protéine Gs de taille attendue de 75 kDa, identique à la protéine Gs sécrétée par le plasmide contrôle pAAV-NiV.Gs (Figure 33). Le WB a montré que le vecteur AAV1 a produit moins de protéine Gs que

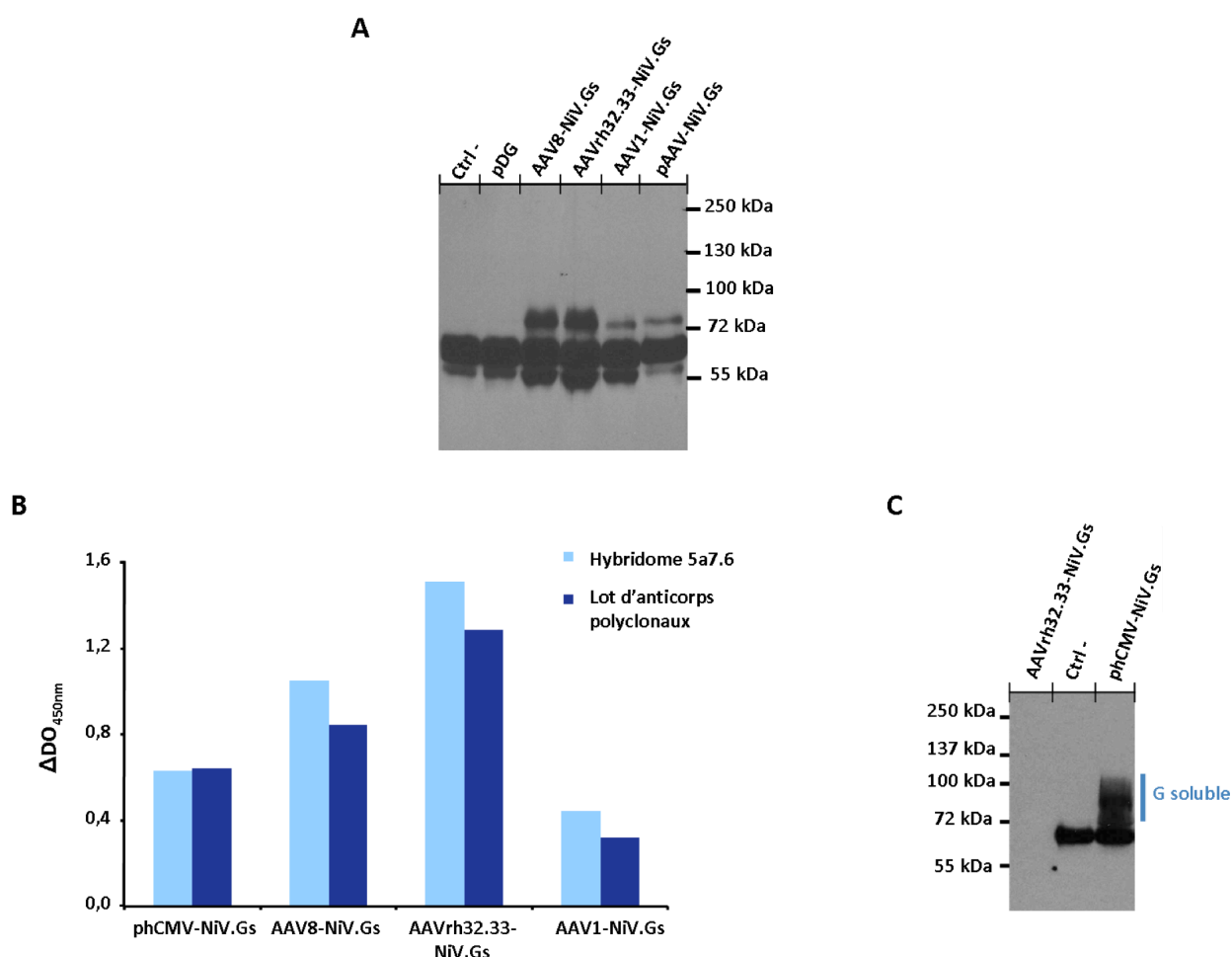


Figure 46. Fonctionnalité des vecteurs AAV-NiV.Gs

Des cellules 293SZ ont été transfectées par le plasmide pDG et le pAAV-NiV.Gs (Ctrl+) puis infectées par les vecteurs AAV1-NiV.Gs, AAV8-NiV.Gs ou AAVrh32.33-NiV.Gs (MOI de 1.10^5 à 4.10^5). La présence de la protéine Gs a été détectée à 48 h, les lysats cellulaires ont été analysés par WB (A) et les surnageants cellulaires par ELISA (B). Pour le WB, l'anticorps anti-RGS-4xHis a été utilisé. L'hybridome 5a7.6 et le sérum polyclonal ont été utilisés pour détecter la protéine Gs dans le test ELISA. C. 1.10^{11} gp AAVrh32.33-NiV.Gs ont été déposés sur un WB avec un contrôle négatif (surnageant de cellules non transfectées) et un contrôle positif (surnageant de cellules transfectées par le phCMV-NiV.Gs). La présence de protéine Gs a été détectée par l'anticorps anti-RGS-4xHis.

les deux autres vecteurs mais la MOI utilisée peut expliquer cette tendance. En effet, pour des raisons techniques des quantités différentes de virus ont été utilisées pour réaliser ce test. Les surnageants de ces cellules ont été ensuite utilisés non dilués pour le test ELISA. L'hybridome 5a7.6 et le sérum polyclonal ont permis de confirmer la présence de la protéine Gs produite dans le surnageant des cellules infectées par les vecteurs AAV des trois sérotypes.

En conclusion, les vecteurs AAV-NiV.Gs permettent la production d'une protéine Gs sécrétée dans le milieu extracellulaire des cellules infectées. Cette protéine possède la taille attendue et est reconnue par les anticorps spécifiques de la protéine G du virus Nipah.

Avant d'injecter ces vecteurs *in vivo*, la présence de la protéine Gs dans les préparations virales a été analysée (Figure 46C). En effet, lors de la constitution du stock viral, les cellules ont été transfectées par le plasmide pAAV-NiV.Gs ainsi que par les autres plasmides nécessaires à la production virale et a permis non seulement la production des particules d'AAV contenant la séquence codante NiV.Gs mais également la production de protéine Gs dans le surnageant des cellules transfectées. Afin de s'assurer de la pureté du stock viral d'AAV-NiV.Gs et de l'absence de protéine Gs contaminante, un WB a été réalisé sur 10 µl de préparation virale AAVrh32.33-NiV.Gs correspondant à 1.10^{11} gp soit 10 fois plus que la dose injectée chez la souris. Des surnageants de cellules transfectées ou non par le plasmide pCMV-NiV.Gs ont été utilisés comme contrôles. Comme attendu, la protéine Gs a été détectée dans le surnageant du contrôle positif. En revanche, aucune protéine Gs n'a été observée dans le stock viral. L'administration de ces vecteurs chez la souris a ainsi pu être réalisée.

2.2.3.2 Comparaison des réponses humores induites par une protéine G membranaire ou soluble

Des souris Balb/c (n=5) ont été injectées par voie IM par 2.10^{10} p. de vecteurs AAV8-NiV.G ou AAV8-NiV.Gs. L'apparition des réponses humores a été suivie au cours du temps durant 12 semaines (Figure 47A et B).

La forme membranaire de la protéine G induit les mêmes réponses humores que celles observées précédemment (Figure 44). Les IgG et les AcN spécifiques de la protéine G apparaissent entre les semaines 4 et 6 et atteignent un plateau vers la semaine 10 après injection. En revanche pour la forme sécrétée de la protéine G, aucune réponse anticorps n'a pu être détectée sur une période de 12 semaines. En effet, un signal est considéré comme spécifique lorsque la $\Delta DO_{450nm} > 0.2$ dans le cas du test ELISA ou à 20 % d'inhibition dans le cas du test de séroneutralisation. Il est possible que la dose de vecteur injectée n'a pas été

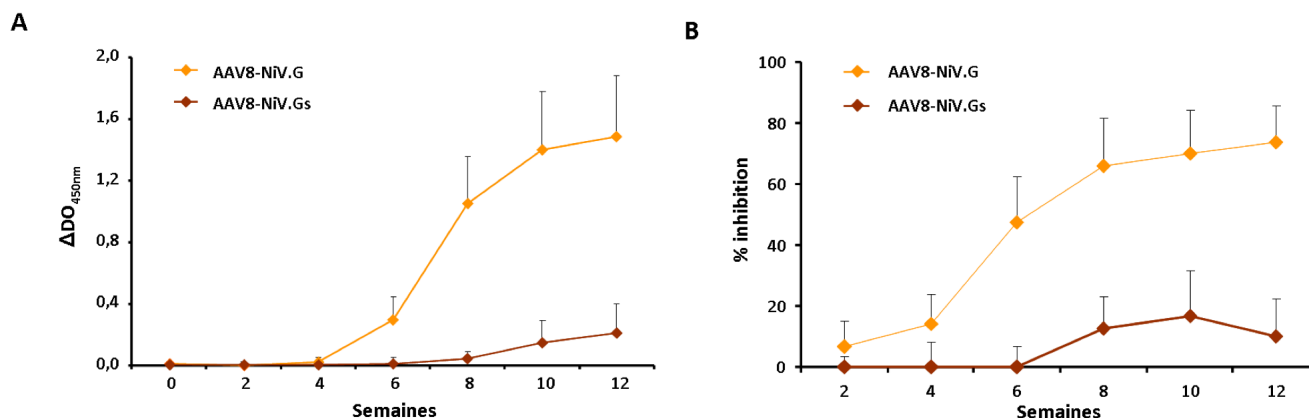


Figure 47. Injection des vecteurs AAV8-NiV.G et AAV8-NiV.Gs chez la souris

Des souris Balb/c (n=5) ont été injectées par voie IM avec le vecteur AAV8-NiV.G ou le vecteur AAV8-NiV.Gs (2.10^{10} gp). Toutes les 2 semaines, les sérums ont été prélevés et analysés pour détecter la présence d'IgG (A) et d'AcN (B) spécifiques de la protéine G. Un signal est considéré comme non spécifique quand il est inférieur à un $ODO_{450\text{ nm}} < 0.2$ ou inférieur à 20 % d'inhibition.

suffisante pour obtenir une sécrétion efficace de Gs dans la circulation. En effet, comme nous l'avons vu lors de la caractérisation de la construction codant pour la Gs, la majorité de la protéine reste intra-cellulaire. Une augmentation de la dose de vecteur injecté permettrait de vérifier si des réponses humores peuvent être obtenues dans ces conditions et de les comparer à celles produites par la protéine G sauvage

2.3 ETUDES COMPLÉMENTAIRES DANS LE MODÈLE HAMSTER

2.3.1 Injection des vecteurs AAV chez le hamster

Cette partie décrit les études préliminaires que nous avons effectuées dans le modèle hamster avant de réaliser l'expérience décrite dans l'Article.

Une première expérience a été réalisée pour définir la dose de vecteurs AAV-NiV. G qui doit être injectée chez le hamster pour induire des réponses humores à un niveau significatif. Pour cela, des hamsters (n=5) ont été injectés par voie IM avec deux doses de vecteurs AAV8-NiV.G, 2.10^{10} gp, dose injectée aux souris, et 6.10^{11} gp. Seule la dose correspondant à 6.10^{11} gp a permis d'observer l'apparition d'une réponse IgG et AcN spécifiques de la protéine G (résultats non montrés). Cette réponse anticorps a augmenté dans le temps pour atteindre un maximum entre les semaines 4 et 6 puis a diminué pour devenir stable vers la semaine 10 (Figure 5 de l'article). Une seconde injection de vecteurs AAV IM a ensuite été réalisée à la semaine 12 avec le vecteur AAVrh32.33 comme pour le test réalisé chez la souris (Figure 48).

Comme observé chez la souris, cette deuxième injection n'a pas permis d'augmenter de façon rapide et efficace la réponse IgG (Figure 48A). De même, le titre en AcN n'a augmenté que légèrement et de façon non significative (Figure 48B). En effet, dans ce cas un seul animal sur cinq a répondu de façon positive à la seconde injection de vecteurs AAV.

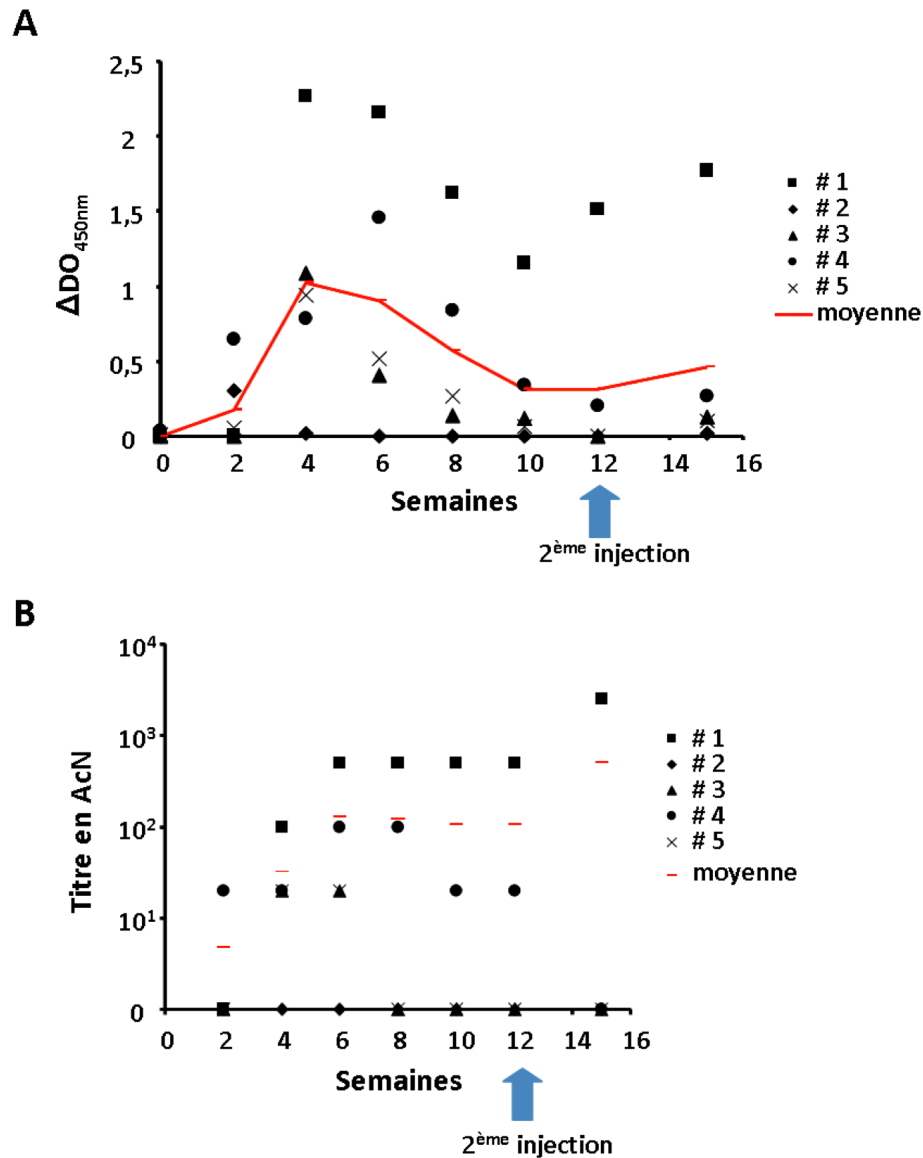


Figure 48. Immunisations successives chez le hamster

Des hamsters (n=5) ont été injectés IM par le vecteur AAV8-NiV.G ($6 \cdot 10^{11}$ gp). Une seconde injection de vecteurs AAVrh32.33-NiV.G ($6 \cdot 10^{11}$ gp) a été réalisée à la semaine 12 en IM. Les sérums dilués au 1/100 ont été analysés par ELISA afin de détecter la présence d'IgG au cours du temps (A). Le test de séroneutralisation a été réalisé sur les sérums dilués successivement à partir du 1/20 afin de déterminer le titre en AcN spécifique de la protéine G (B). Le titre représente la dernière dilution de sérum permettant d'obtenir une $CI_{50\%}$. L'animal #1 est le seul répondant à la seconde injection de vecteur.

Malgré la forte variabilité inter-animal observée dans cette première expérience, ces résultats indiquent que comme dans le cas de la souris, une injection de rappel avec un deuxième sérotype d'AAV-NiV.G ne permet pas d'augmenter de façon significative les réponses humores chez le hamster.

Afin d'obtenir des résultats plus représentatifs concernant le type de réponse humorale induite par une injection de vecteurs AAV8-NiV.G, une seconde expérience *in vivo* a été réalisée sur un nombre plus important d'animaux ($n=18$). Tous les hamsters ont été immunisés par le vecteur AAV8-NiV.G (6.10^{11} gp) et les réponses humores ont été observées à la semaine 5, c'est-à-dire au sommet de la réponse anticorps. La répartition des titres en IgG totaux est relativement homogène avec une majorité d'animaux possédant un titre supérieur à 1000 (Figure 49A). De plus, les 18 animaux ont un titre en IgG2 supérieur au titre à celui en IgG1, compris entre 100 et 1000 (Figure 49B). Le titre en AcN est compris entre 100 et 1000 pour la majorité des animaux (Figure 49C).

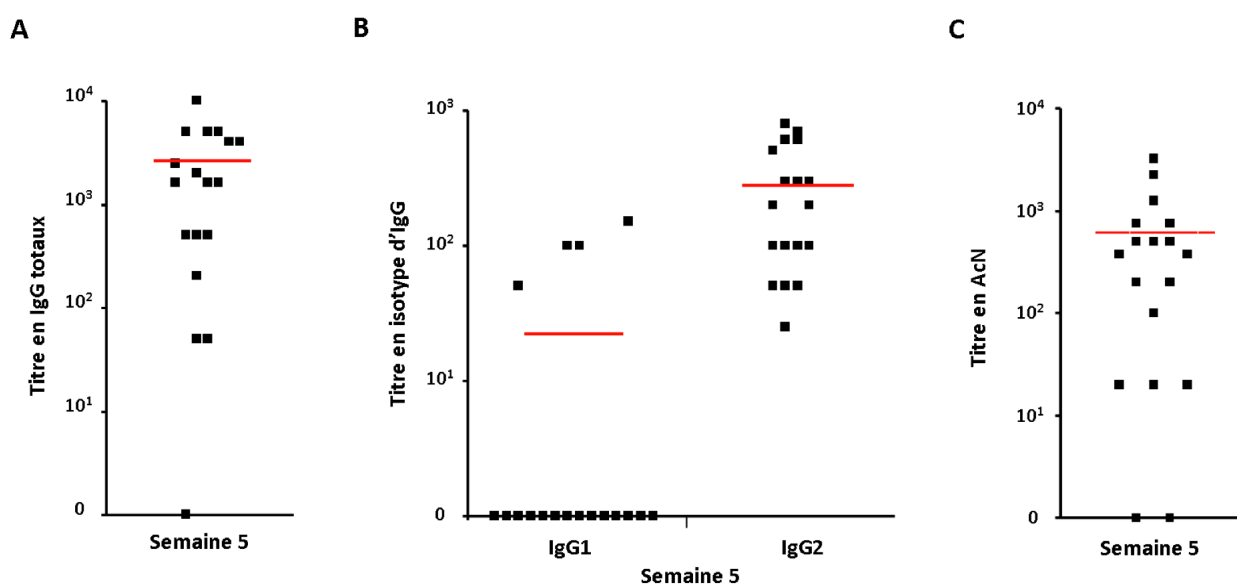


Figure 49. Distribution des réponses humores chez le hamster

18 hamsters ont été injectés par le vecteur AAV8-NiV.G (6.10^{11} gp) par voie IM. Les réponses humores ont été analysées à la semaine 5. Titres en IgG totaux (A) et en isotype d'IgG (B) déterminés par ELISA. Les titres représentent la dernière dilution de sérum permettant d'obtenir un $\Delta DO_{450nm} < 0,2$. C. Titres en AcN spécifiques de la protéine G représentant la dernière dilution de sérum permettant l'obtention d'une $CI_{50\%}$. La barre rouge indique le titre moyen pour les 18 animaux.

L'analyse de ces 18 animaux a permis de caractériser en détail les réponses humores induites par l'injection du vecteur AAV8-NiV.G chez le hamster. Une partie de ces animaux a ensuite été utilisée pour la publication concernant les épreuves virales par les virus Nipah et Hendra.

2.3.2 Analyse de l'effet protecteur du vaccin AAV-NiV.G vis-à-vis du virus Nipah

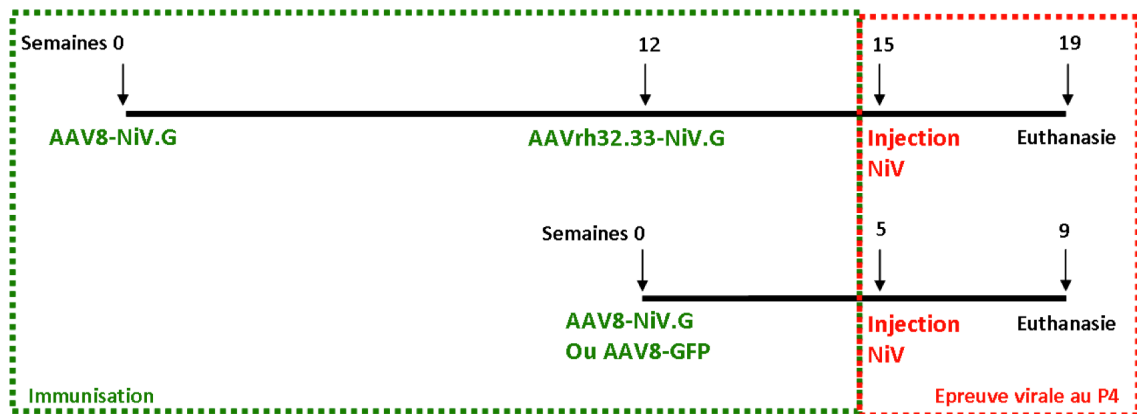
L'injection de vecteurs AAV8-NiV.G chez le hamster a permis le développement d'une réponse humorale avec la présence d'AcN spécifiques de la protéine NiV G. L'efficacité de cette réponse humorale a été évaluée lors d'une épreuve virale consistant à infecter des hamsters, préalablement vaccinés, par le virus NiV. Lors de cette première expérience nous avons utilisé une dose de virus NiV de 1000 pfu précédemment décrite comme étant suffisant pour induire 100 % de létalité chez des hamsters naïfs dès les jours 5-6 après infection (Wong *et al.*, 2003).

La première expérience de validation du pouvoir protecteur du vaccin AAV face à une infection par le virus NiV a été réalisée sur deux groupes d'animaux différents (Figure 50A). Le premier groupe (n=5) a été immunisé par le vecteur AAV8-NiV.G et a été infecté par le virus NiV à la semaine 5, au maximum de la réponse humorale observée. Le second groupe (n=5), présenté précédemment, a été immunisé une première fois par le vecteur AAV8-NiV.G puis a subi une 2^{ème} immunisation par le vecteur AAVrh32.33 à la semaine 12. Le groupe d'animaux ayant reçu 2 injections de vecteurs AAV successives a été infecté par le virus NiV, 3 semaines après la 2^{ème} immunisation (Figure 50A). Les deux groupes ont reçu au même moment une dose de 1000 pfu de virus NiV par voie IP au sein du laboratoire P4. Deux groupes contrôles ont également été infectés par le virus NiV, à savoir, un groupe de 3 animaux naïfs pour le groupe doublement immunisé et un groupe de 3 animaux vaccinés par le vecteur AAV8-GFP, pour le groupe ayant reçu une simple immunisation.

Dans les groupes contrôles, après injection du virus NiV, 4 animaux sur 6 ont été euthanasiés après avoir développé des signes cliniques d'infection (Figure 50B). Les deux animaux restants, à savoir, un dans chaque groupe contrôle, n'ont développé aucun symptôme de la maladie et ont survécu jusqu'à la fin du protocole. De plus, ces animaux ont montré une stagnation de leur poids jusqu'à leur euthanasie. Concernant le groupe ayant reçu une seule immunisation, 4 animaux sur 5 ont survécu (Figure 50B). Le cinquième animal a été euthanasié 20 jours post-infection (p.i) mais l'analyse post-mortem a montré que cet animal possédait des AcN et les symptômes ne correspondaient pas à ceux définis pour l'infection par le virus NiV. Dans le groupe double immunisation, 1 animal a été euthanasié 9 jours p.i. Ce résultat était attendu car cet animal n'avait développé aucun AcN après les 2 immunisations par les vecteurs AAV (animal #2 Figure 48). Aucune perte de poids et aucun symptôme n'ont été observés pour tous les animaux vaccinés ayant survécu à l'épreuve virale. En revanche, il est à noter que la courbe de poids des animaux doublement immunisés a augmenté plus lentement par rapport à l'autre groupe simplement immunisé. Ces animaux étant plus âgés que les autres au moment de l'infection par le virus NiV et n'ayant pas d'animaux contrôles du même âge non infectés par le virus NiV, nous ne

pouvons pas savoir si cette stagnation de poids est provoquée par l'injection du virus NiV ou correspond à la croissance normale d'un hamster non infecté. Tous les animaux ont été euthanasiés un mois après infection par le virus NiV et plusieurs paramètres ont été analysés et récapitulés dans le Tableau 8.

A



B

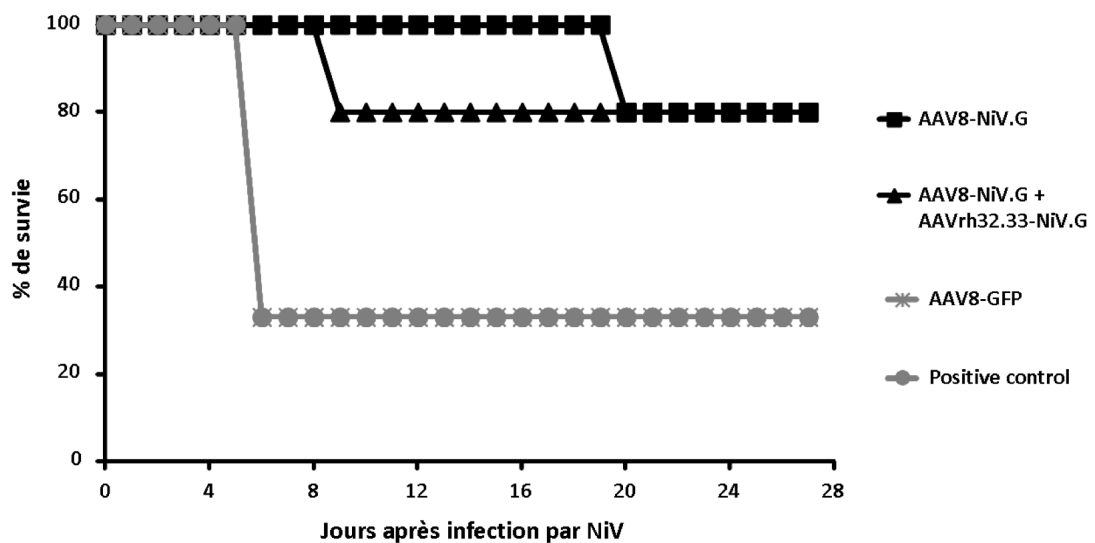


Figure 50. Schéma explicatif de l'épreuve virale et courbes de survie

A. Deux groupes de hamsters ont été immunisés par voie IM soit par une seule injection de vecteurs AAV8-NiV.G (6.10^{11} gp) soit par deux injections de vecteurs AAV8-NiV.G (6.10^{11} gp) et AAVrh32.33-NiV.G (6.10^{11} gp) réalisées à 12 semaines d'intervalle. Un groupe de 3 hamsters a reçu le vecteur AAV8-GFP (6.10^{11} gp) et un groupe de 3 hamsters naïfs (non montré ici) ont été utilisés comme contrôles. A la semaine 5 ou 15 (suivant les groupes), une dose de 1000 pfu de virus NiV a été administrée par voie IP aux animaux vaccinés ou non dans le laboratoire P4. Les animaux survivants ont été suivis quotidiennement pendant 28 jours. **B.** Courbes de survie des différents groupes.

Pour les animaux contrôles dont les organes ont pu être récupérés (1/4), la présence d'ARN de NiV a pu être détectée dans la rate et les poumons. L'ARN du virus NiV a été détecté dans la rate et le cerveau de l'animal #2 du groupe doublement immunisé, n'ayant développé aucun AcN durant la période d'immunisation et euthanasié à J9 p.i. En revanche, aucun ARN viral n'a pu être détecté pour les autres animaux doublement immunisés. La présence de NiV circulant a été analysée dans les sérums des animaux prélevés 5 jours après infection (Guillaume *et al.*, 2004b). Le virus NiV circulant a été détecté chez les contrôles négatifs (4/4) mais pas chez l'animal #2 du groupe doublement immunisés, ce qui confirme que cet animal n'a pas développé l'infection par le virus NiV.

Comme montré précédemment (Figure 40), les titres en AcN avant injection par le virus NiV, déterminés par le test de séroneutralisation utilisant les VLP NiV donnent des titres plus élevés que ceux obtenus au P4 avec le NiV sauvage. Pour le groupe ayant reçu une seule immunisation, les titres en AcN avant et après infection varient très légèrement ce qui signifie que le virus n'a pas eu le temps de se répliquer avant son élimination de l'organisme. Une augmentation plus importante est observée pour le groupe doublement immunisé, ce qui suggère qu'il y a eu une réplication du virus mais qu'il a ensuite été éliminé, comme le montre l'absence d'ARN viral dans les organes analysés ainsi que la survie des animaux.

Les résultats de cette première expérience ont montré qu'une seule injection de vecteurs AAV8-NiV.G a permis de protéger 80 % des animaux infectés par le virus NiV. Ces données n'ont pas pu être soumises à publication à cause du faible nombre d'animaux par groupe et de la survie non attendue de 2 animaux sur 6 pour les groupes contrôles (33 %). Ce phénomène de survie chez les animaux contrôles a pu être de nouveau observé dans une autre expérience où les hamsters (n=6) ont été vaccinés par l'AAV8-GFP et infectés par 1000 pfu de virus NiV. En effet, 2 animaux contrôles sur 6 ont survécu jusqu'à la fin du protocole sans montrer le moindre signe clinique (résultats non montrés). Par précaution, une dose de 10 000 pfu de virus NiV a été utilisée pour l'expérience de l'épreuve virale publiée dans l'article présenté précédemment et a permis d'obtenir 100 % de mortalité chez les contrôles négatifs.

Cependant, cette expérience nous permet de tirer quelques conclusions sur le niveau en AcN nécessaire pour protéger les animaux contre une infection par le virus NiV. En effet, nous pouvons observer dès à présent que les animaux doublement vaccinés ont résisté efficacement à l'infection malgré un niveau en AcN beaucoup plus faible que celui présent dans les animaux ayant reçu une seule injection. Ce point, suggère qu'un très faible niveau en AcN anti NiV est suffisant pour induire un effet protecteur. Par ailleurs il est aussi possible que la protection soit due à l'induction d'une réponse de type cellulaire, non mesurée dans ces expériences (voir Discussion).

Vaccination	Animal N°-#	Euth/mort jours p.i	AcN avant injection de NiV		AcN après injection de NiV (P4)		ARN viral de NiV		
			test VLP NiV	test NiV wt P4	12 jours p.i	sérum 5j p.i	Rate	Poumon	Cerveaux
AAV8-NiV.G	1	27	500	40	80	-	-	-	-
	2	20	100	<20	20	-	-	-	-
	3	27	100	<20	20	-	-	-	-
	4	27	20	<20	<20	-	-	-	-
	5	27	20	<20	20	-	-	-	-
AAV8-NiV.G + AAVrh32.33-NiV.G	1	27	2500	160	160	-	-	-	-
	2	9	<20	<20	160	-	+	-	+
	3	27	<20	<20	160	-	-	-	-
	4	27	<20	<20	40	-	-	-	-
	5	27	<20	<20	<20	-	-	-	-
AAV8-GFP	1	27	<20	<20	<20	-	-	-	-
	2	6	<20	<20	<20	+	+	+	-
	3	6 †	<20	<20	<20	+	nd	nd	nd
Naïfs	1	27	<20	<20	<20	-	-	-	-
	2	6 †	<20	<20	<20	+	nd	nd	nd
	3	6 †	<20	<20	<20	+	nd	nd	nd

Tableau 8. Récapitulatif des résultats concernant l'épreuve virale par 1000 pfu de NiV.

Les animaux vaccinés par 1 ou 2 immunisations successives et les animaux contrôles ont été euthanasiés aux temps indiqués p.i. Aux temps 5 ou 15 semaines après immunisation (avant injection de NiV), les AcN anti-NiV ont été titrés par le test de séroneutralisation utilisant les VLP NiV ou en parallèle le virus NiV sauvage au laboratoire P4. Les AcN anti-NiV 12 jours p.i ont été quantifiés par le test de séroneutralisation avec le virus NiV sauvage. † : animal retrouvé mort dans la cage; nd : non déterminé.

DISCUSSION

1. OUTILS DÉVELOPPÉS

Dans la première partie de ce travail de thèse, deux techniques ont été développées afin de pouvoir détecter les anticorps anti-NiV.G, un test ELISA utilisant une protéine Gs et un test de séroneutralisation basé sur des VLP portant les glycoprotéines d'enveloppe du virus NiV. Deux points importants relatifs à l'utilisation de ces techniques sont discutés dans ce chapitre.

1.1 DÉVELOPPEMENT DE LA PROTÉINE G SOLUBLE

Le premier point à discuter concerne l'optimisation de la production de la protéine Gs. En effet, bien que la quantité de protéine Gs produite par les cellules HeLa ou 293SZ ait été suffisante pour développer le test ELISA, cette quantité a été insuffisante pour pouvoir purifier cette protéine. De plus, nous avons aussi remarqué que la majorité de la protéine restait à l'intérieur des cellules et n'était pas sécrétée dans le surnageant malgré la fusion avec un peptide signal (voir Résultats, Chapitre 1.2.1). Une hypothèse que nous avons avancée pour expliquer ce phénomène implique une recapture de la protéine produite dans le surnageant par les cellules via le récepteur EphrinB2. En effet, une étude a mis en évidence que la co-expression des protéines G et EphrinB2 entraîne l'internalisation des deux protéines par endocytose. Ces protéines sont ensuite maintenues dans des vésicules intracellulaires, ce qui provoque un changement phénotypique des cellules se traduisant par une réduction du nombre de filopodes. Cette internalisation pourrait entraîner la dégradation de la protéine EphrinB2 suite à la fusion des vésicules avec des lysosomes et donc une diminution de son expression à la surface membranaire (Pernet *et al.*, 2009). Les tests de fusion, que nous avons réalisés en transfectant les plasmides codant pour les deux protéines F et G, ont montré la formation de syncytia et ont donc permis de prouver l'existence du récepteur EphrinB2 à la surface des cellules, bien que la présence de ce récepteur n'ait pas été confirmée par une analyse par qPCR (Mathieu *et al.*, 2011). Ainsi, lors de la production de la protéine Gs, il est possible que la protéine sécrétée se soit fixée au récepteur EphrinB2 membranaire et ait ensuite été internalisée. De plus, cette fixation pourrait également entraîner une diminution de la sécrétion extra-cellulaire de la protéine Gs par le système vésiculaire. En effet, la protéine EphrinB2 joue un rôle important dans la formation de la plaque d'adhérence focale et dans la migration polarisée des cellules (Foo *et al.*, 2006). Une observation plus attentive des cellules transfectées serait à réaliser pour confirmer la perturbation de la mobilité cellulaire. Cette hypothèse expliquerait également le fait que nous n'ayons pas réussi à obtenir des clones cellulaires stables sécrétant la

protéine Gs dans le surnageant alors que la protéine a toujours été détectée en intracellulaire (Figure 34A). De ce fait, des cellules n'exprimant pas le récepteur EphrinB2, telles que des cellules CXHO-K1 ou des cellules HeLa dépourvues de ce récepteur (Bossart *et al.*, 2005a), pourraient être utilisées afin d'augmenter la quantité de protéine Gs produite dans le surnageant.

1.2 VLP PSEUDOTYPÉES PAR LES PROTÉINES F ET G DU VIRUS NIPAH

Dans ce travail de thèse, nous avons développé un test de séroneutralisation utilisant des pseudoparticules rétrovirales (MLV) portant à leur surface les glycoprotéines F et G du virus NiV (VLP-NiV). Ce test a été comparé à celui réalisé au laboratoire P4 et reposant sur l'utilisation de virus NiV wt. Comme indiqué dans la partie Résultats (Chapitre 1.3.3), nous avons observé une forte corrélation entre ces deux tests permettant la détection d'AcN spécifiques du virus NiV. Cependant, le coefficient de corrélation calculé par régression linéaire sur les résultats obtenus avec les sérums de souris est inférieur à celui calculé avec les sérums de hamsters. Cette différence est probablement dépendante de l'expérimentateur plutôt que de l'espèce animale. En effet, tous les tests effectués avec les VLP-NiV ont été réalisés au laboratoire par un seul expérimentateur et de façon standardisée. En revanche, les tests de séroneutralisation sur les sérums de souris et de hamsters ont été réalisés au laboratoire P4 par deux expérimentateurs différents et avec deux lots de virus NiV.

Nous avons également constaté que le test de séroneutralisation utilisant les VLP-NiV a permis d'obtenir des titres en AcN plus forts que ceux obtenus avec le test utilisant le virus NiV wt. Cette tendance pourrait s'expliquer par l'émergence de mutations spontanées au niveau de la protéine G survenant lors de la propagation du virus NiV en culture. Il est ainsi possible que quelques variants du virus NiV wt aient pu échapper à la neutralisation par les AcN produits à partir d'une séquence unique NiV G clonée (Guillaume *et al.*, 2006a). De plus, afin de pouvoir incorporer les protéines F et G à la surface des VLP, une partie des domaines cytoplasmiques de ces protéines a dû être supprimée. Cette modification a pu entraîner de légères modifications conformationnelles résultant dans l'exposition d'épitopes habituellement cachés, augmentant ainsi le niveau de neutralisation des VLP par des anticorps spécifiques.

Il est également important de noter que nous ne sommes pas les seuls à avoir développé des VLP portant les glycoprotéines d'enveloppe du virus NiV. Des vecteurs recombinants VSV codant pour un gène rapporteur et pseudotypés par les protéines F et G du virus NiV ont été développés et utilisés dans diverses expériences, y compris pour le

développement d'un test de séroneutralisation (Johnson *et al.*, 2011; Negrete *et al.*, 2007; Negrete *et al.*, 2005; Negrete *et al.*, 2006; Tamin *et al.*, 2009; Wang *et al.*, 2006). Dans ce dernier test, des VLP possédant un core VSV, pseudotypées avec les glycoprotéines F et G du virus NiV ont été comparées à un test de séroneutralisation réalisé au laboratoire P4 avec le virus NiV wt afin d'évaluer la présence d'AcN porcins (Tamin *et al.*, 2009). Il est important de noter que ces VLP de type VSV portent le gène rapporteur de la luciférase et que la détection des AcN a été réalisée par un test mesurant l'activité de cette enzyme. De plus, l'intégralité des protéines F et G a été incorporée dans ces VLP de type VSV. Le test de séroneutralisation utilisant ces VLP a été considéré comme étant plus sensible et plus spécifique que celui utilisant le virus NiV wt, ce qui concorde avec nos propres résultats. De plus, le coefficient de corrélation entre le test utilisant les VLP de type VSV et celui utilisant du virus NiV wt était de 0,51 alors que dans notre cas des valeurs supérieures à 0,8 ont été obtenues. Le test que nous avons développé semble donc plus performant et comparable à celui utilisant du virus NiV wt. Récemment, ces VLP de type VSV pseudotypées, codant pour la mSEAP, ont prouvé leur efficacité pour détecter la présence d'AcN chez de nombreuses espèces animales (Kaku *et al.*, 2012). Un autre type de particules pseudotypées par les protéines F et G a été également développé en utilisant la propriété de bourgeonnement de la protéine de matrice M du virus NiV (Patch *et al.*, 2007). Ces VLP obtenues ont été étudiées *in vivo* et ont démontré leur capacité à induire une réponse humorale spécifique (Walpita *et al.*, 2011). Enfin en 2010, des vecteurs lentiviraux HIV codant pour la luciférase ont été pseudotypés par les glycoprotéines d'enveloppe du virus NiV (Khetawat and Broder, 2010). Les protéines F et G ont été incorporées en totalité ou tronquées. Cependant ces VLP possédant un core HIV n'ont pas encore été utilisées *in vitro* pour détecter la présence d'AcN ou dans des tests de vaccination. Il est important de rappeler que dans notre cas, les VLP-NiV que nous avons développées, ont aussi été utilisées dans des tests *in vitro* afin d'évaluer l'infectivité des cellules immunitaires humaines telles que des CD et des macrophages (Mathieu *et al.*, 2011).

Ainsi, bien que l'utilisation de VLP pour détecter la présence des AcN anti-NiV ne soit pas une nouveauté, nous avons été les seuls à développer des VLP basées sur un core MLV. De plus, ce système semble donner des résultats plus comparables à ceux obtenus avec l'utilisation du NiV sauvage que les autres tests présentés. Enfin, peu d'équipes utilisent ce système pour quantifier les AcN et préfèrent utiliser le système de microsphères Bio-Plex couplées aux protéines des Hénipavirus (Bossart *et al.*, 2007).

2. IMMUNITÉ HUMORALE INDUITE PAR LES VECTEURS AAVR

2.1 SIMPLE ADMINISTRATION

La première étape de ce projet a porté sur le développement de vecteurs AAVr codant pour la protéine G du virus NiV et le test de ces vecteurs chez la souris afin d'évaluer leur potentiel à induire des réponses humorales.

Les deux glycoprotéines d'enveloppe des Hénipavirus ont prouvé leurs capacités à induire des réponses humorales fortes. Cependant, la protéine G a démontré un potentiel immunogène plus fort que la protéine F, aussi bien dans le cas du virus NiV que du virus HeV (voir Introduction, Chapitre 4.7). Cependant, chaque année, le virus NiV infecte plus de personnes et d'animaux que le virus HeV, ce qui nous a incité à utiliser la protéine G du virus NiV pour cette étude.

2.1.1 Cinétique des réponses humorales

Nous avons montré qu'une seule injection de vecteurs AAV-NiV.G a permis le développement d'une réponse humorale aussi bien chez la souris que chez le hamster.

Chez la souris, la réponse IgG est apparue entre 4 et 6 semaines après l'injection des vecteurs, a atteint un plateau entre les semaines 8 et 12, et est restée relativement stable dans le temps jusqu'à la semaine 16. Le délai d'apparition de ces réponses humorales est en accord avec plusieurs études. Ces dernières ont démontré que l'injection de vecteurs AAVr induit l'apparition de réponses anticorps un mois après immunisation, pour atteindre un maximum entre 3 et 4 mois après injection et ensuite chuter très lentement dans le temps (Du *et al.*, 2006; Kuck *et al.*, 2006b; Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a; Manning *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b). Concernant les réponses AcN spécifiques de l'antigène, nous avons pu constater que ces AcN se développaient en même temps que les réponses IgG, comme cela est d'ailleurs décrit dans la littérature (Du *et al.*, 2006; Kuck *et al.*, 2006b; Liu *et al.*, 2005b). Les vecteurs AAVr induisent plus lentement des réponses humorales que les autres vecteurs. En effet, avec le vecteur Ad-NiV.G, la réponse humorale apparaît dès la deuxième semaine après l'injection, alors que dans la même étude, la réponse humorale induite par le vecteur AAV8-NiV.G n'apparaît que 2 semaines plus tard (Figure 44A). Ce délai d'apparition des anticorps s'explique par le temps requis pour l'expression maximale du vecteur AAV. En effet, les vecteurs AAVr que nous avons utilisés pour nos expériences sont des vecteurs AAV sb. Lors de l'étape de transduction, le génome d'ADN sb doit être converti en génome d'ADN db pour pouvoir être transcrit. De nombreuses études réalisées chez la

souris ont montré que cette étape dure au minimum 15 jours *in vivo* (Ferrari *et al.*, 1996; Fisher *et al.*, 1996; Nakai, Storm, and Kay, 2000). De plus, il est également très bien décrit que les réponses anticorps apparaissent entre 5 et 15 jours après la rencontre avec l'antigène, avec dans un premier temps, la production d'anticorps IgM, puis dans un deuxième temps l'apparition des IgG (Murphy *et al.*, 2008). Ainsi, ces deux phénomènes cumulés pourraient expliquer le délai d'un mois nécessaire à l'observation des réponses humores après injection des vecteurs AAVr. Afin de réduire ce temps à 2 semaines comme pour le vecteur Ad, un vecteur AAV db (ou sc) pourrait être utilisé (voir Introduction, Chapitre 3.3.2). En effet, un vecteur AAV db permet d'exprimer le transgène plus rapidement en s'affranchissant de l'étape de conversion du génome sb en db. Par exemple, l'étude de Wang *et al.* a comparé l'injection dans des muscles de souris de vecteurs AAV sb ou AAV db codant pour la GFP et sous le contrôle d'un promoteur CMV (Wang *et al.*, 2003). Le vecteur AAV db permet l'expression de la protéine dès la 1^{ère} semaine après l'injection alors qu'il faut attendre entre 2 et 6 semaines pour les vecteurs AAV sb. La cassette d'expression du vecteur AAV sb contenant le promoteur, l'intron, la séquence codante de la protéine G et le poly A possède une taille de 3,3 kb dont 1,8 kb de séquence codante. Un AAV db peut porter une séquence codante de 2,3 kb et au maximum de 3,3 kb (Wu *et al.*, 2007). La construction d'un vecteur AAV db portant la séquence codante de la protéine G du virus NiV pourrait donc être envisagée à condition de réduire la taille des séquences non codantes.

Le fond génétique des souris semble aussi être un facteur critique pour la vitesse d'expression de l'antigène. En effet, une réponse humorale plus rapide est observée chez les souris C57Bl/6 par rapport aux souris Balb/c. Cette tendance a pu être observée dans quelques études utilisant des C57Bl/6, où l'injection de vecteurs AAVr, à des doses comprises entre 1.10^{10} gp et 1.10^{11} gp par animal par voie IM, a induit l'apparition de la réponse humorale entre 1 et 3 semaines (Adriouch *et al.*, 2011; Kuck *et al.*, 2006b; Manning *et al.*, 1997). De même, dans une étude préliminaire à ce travail, une injection de vecteurs AAV-NiV.G réalisée par voie IM sur un petit nombre de souris C57Bl/6 a permis d'obtenir des AcN après 3 semaines (données non montrées). De plus, des variations de cinétiques d'expressions des protéines telles que la GFP ou la luciférase ont été observées chez ces deux types de souris (Mays *et al.*, 2009). Une étude comparative de ces deux modèles de souris serait donc intéressante à mener dans un contexte vaccinal. Il est important de remarquer que la plupart des études de vaccination utilisant les vecteurs AAVr ont été réalisées chez les souris Balb/c.

Jusqu'à présent, aucune étude ne s'est focalisée sur l'analyse des réponses humores après injection de vecteurs AAVr chez le hamster. Les seules études utilisant des vecteurs AAVr et des hamsters sont des essais de thérapie génique pour le traitement des cardiomyopathies, des dystrophies musculaires ou du cancer du pancréas (Noro *et al.*, 2004;

Rotundo *et al.*, 2011; Vitiello *et al.*, 2009). Nous ne pouvons donc pas comparer les résultats que nous avons obtenus avec d'autres études. En revanche, nous avons pu constater que la cinétique d'apparition de la réponse humorale chez le hamster n'était pas similaire à celle observée avec chez la souris. En effet, les réponses IgG spécifiques de la protéine G du virus NiV sont apparues entre les semaines 2 et 4 avec le maximum de la réponse atteint à la semaine 4, pour chuter jusqu'à la semaine 10, puis se stabiliser jusqu'à la semaine 12 (Figure 5A de l'article). Alors que la réponse IgG spécifique chute après la semaine 6, la réponse AcN, reste quant à elle constante et maximale jusqu'à la semaine 12. La persistance d'une réponse stable en AcN au cours du temps, malgré une chute des IgG, pourrait s'expliquer par l'augmentation de leur affinité et/ou de leur avidité. La différence en terme de cinétique de réponse humorale observée chez la souris et chez le hamster, après l'injection du même vecteur AAV8-NiV.G par voie IM, peut être expliquée par un effet dépendant de la dose de vecteurs AAV injectée par animal, ou par une spécificité des réponses immunitaires propres à chacune de ces espèces de rongeur. Dans notre étude, la protéine G est immunogène mais elle est probablement perçue de façon différente selon l'espèce animale et le fond génétique, ce qui pourrait expliquer un profil d'induction des réponses humorales différent. Pour vérifier cette hypothèse, une étude de dose-réponse menée en parallèle chez la souris et le hamster serait à envisager.

2.1.2 Effet de la voie d'administration

Afin d'évaluer l'impact des voies d'injection sur la réponse humorale, deux voies d'administration ont été comparées ; la voie IM et la voie ID. Comme nous l'avons vu dans l'Introduction (Chapitre 1.2.1), ces deux voies d'injection impliquent des cellules immunitaires différentes, pouvant adresser l'antigène plus ou moins efficacement et rapidement aux CPA. Chez la souris, nous avons pu constater que la voie d'injection IM induit des réponses humorales plus rapides et légèrement plus importantes que la voie ID. C'est la première fois que ces deux voies d'injection sont comparées en même temps dans un contexte de vaccination chez la souris. De plus, ces données sont en accord avec d'autres études comparant l'injection de vecteurs AAVr par voies IM, SC, IP, IN et IV. Dans ces études, la voie IM permet l'obtention de la réponse humorale la plus forte comparée aux quatre autres voies d'injection citées (Brockstedt *et al.*, 1999; Xin *et al.*, 2001b).

Chez le hamster par contre, l'induction des réponses humorales par voies IM et ID n'a pas été comparée.

2.1.3 Effet de la dose

Pour les expériences réalisées chez la souris, nous n'avons pas effectué de dose-réponse. Des doses de 1.10^{10} gp et 2.10^{10} gp par animal ont été respectivement utilisées pour l'administration des vecteurs par voie ID et IM. Ces doses ont été définies après analyse des doses de vecteurs utilisées dans les études de vaccination décrites dans la littérature et qui varient de 1.10^{10} à 2.10^{11} gp/animal. Une dose de vecteurs plus importante pourrait augmenter la réponse humorale de façon quantitative et aussi accélérer la production d'anticorps. Par exemple, dans la publication de Manning *et al.* l'utilisation d'une dose croissante de vecteurs AAV2 codant pour la protéine gB de l'HSV-2 a permis d'augmenter le délai d'apparition de la réponse anticorps spécifiques (Manning *et al.*, 1997; Xin *et al.*, 2002; Xin *et al.*, 2001b). La comparaison de différentes doses de vecteur permettrait aussi de vérifier si la différence observée entre la voie IM et ID est maintenue, voire accrue, en augmentant le nombre de particules injectées.

En revanche, chez le hamster, deux doses d'AAVr ont été injectées par voie IM : la même dose que celle utilisée chez la souris, 2.10^{10} gp, et une dose plus forte de 6.10^{11} gp par animal. Seule la dose la plus forte a permis l'induction d'une réponse humorale dirigée contre la protéine G du virus NiV. En revanche, la dose la plus faible n'a pour sa part pas entraîné l'apparition d'anticorps, et cela malgré un rappel réalisé 10 semaines après la 1^{ère} injection (données non montrées). Pour comparaison, la seule étude de vaccination comportant l'injection de vecteurs AAV chez des hamsters par voie IM a utilisé une dose de vecteur 1.10^{11} gp par animal (Noro *et al.*, 2004).

2.1.4 Effet des sérotypes d'AAVr

Au cours de ce travail de thèse, nous avons également comparé trois sérotypes d'AAV lors de leurs injections par les deux voies décrites précédemment. Les sérotypes 1, 8 et rh32.33 ont été comparés afin de déterminer le sérotype permettant d'induire la plus forte réponse humorale spécifique de la protéine G du virus NiV. Le sérotype 1 a été sélectionné pour sa capacité à transduire efficacement les fibres musculaires, le sérotype 8 pour son large tropisme cellulaire et sa capacité à induire une forte réponse humorale, et le sérotype rh32.33 pour sa capacité d'induction d'une forte réponse cellulaire (Gao *et al.*, 2002b; Lin *et al.*, 2009; Xiao *et al.*, 1999a; Xin *et al.*, 2006). Dans les expériences que nous avons réalisés, le vecteur AAV8 a montré une capacité à induire des réponses IgG et AcN supérieures aux autres sérotypes lorsqu'il est injecté par la voie IM. Concernant la voie ID, il semble que les vecteurs AAV8 et AAVrh32.33 induisent des AcN à la même vitesse, avec toutefois des titres inférieurs à ceux obtenus par la voie IM. L'étude de Lin *et al.* en 2009 avait également montré que le vecteur AAV8 permettait d'induire une réponse humorale

plus forte que le vecteur AAVrh32.33 et ce, dans des conditions expérimentales presque identiques aux nôtres (Lin *et al.*, 2009). Nos résultats sont également en accord avec la publication de Lin *et al.* de 2007, qui démontre que le vecteur AAV8 induit une meilleure réponse humorale que le vecteur AAV1 (Lin *et al.*, 2007a).

Il est important de souligner, que bien que le vecteur AAV1 soit connu pour transduire le plus efficacement les fibres musculaires, ce n'est pas celui qui induit la réponse humorale la plus forte dans notre étude. Plusieurs hypothèses peuvent expliquer ce résultat. Rappelons tout d'abord que la transduction des cellules par des vecteurs AAVr peut être bloquée à plusieurs niveaux : lors de l'étape d'entrée dans la cellule suite à la reconnaissance du récepteur cellulaire, au cours du trajet qu'effectue la particule dans le cytoplasme pour rejoindre le noyau, lors de l'étape de décapsidation du génome et enfin pendant la conversion du génome simple brin en double brin. Bien que la littérature décrive l'AAV1 comme le plus efficace pour la transduction du muscle squelettique, il est possible que dans notre cas le vecteur AAV8 ait permis à une meilleure expression de la protéine G, résultant ainsi en une plus forte production d'anticorps. Cette hypothèse pourrait être vérifiée en analysant la quantité d'ARNm et en protéine G au sein du muscle transduit. Des analyses ultérieures pourraient aussi être réalisées pour comparer d'autres étapes du processus de transduction du muscle par ces sérotypes d'AAVr, comme l'étape de décapsidation intra-nucléaire qui peut influencer la qualité de la transduction (Thomas *et al.*, 2004; Wang *et al.*, 2007).

Un autre point important est la présentation de l'antigène au système immunitaire. En effet, une fois transduites, les fibres musculaires expriment l'antigène et le présentent aux molécules du CMH-II. Cependant, il est improbable que le mode de présentation de l'antigène diffère en fonction du vecteur utilisé pour la transduction (voir Introduction, Chapitre 1.2.1) même si nous ne savons pas si la quantité d'antigène exprimée peut jouer un rôle sur la qualité de la présentation peptidique.

Une deuxième hypothèse concerne le tropisme des vecteurs AAVr. L'induction d'une forte réponse humorale observée après l'injection du vecteur AAV8 pourrait provenir de sa capacité à infecter de nombreux types cellulaires, de par son co-récepteur, la laminine, étant une protéine exprimée à la surface de nombreuses cellules. En effet, suite à une inflammation, les cellules endothéliales dermales expriment la laminine $\alpha 4$ et permettent le recrutement de leucocytes (Kenne *et al.*, 2010). Les membranes basales des myotubes et des myofibres matures ainsi que les cellules épithéliales vasculaires expriment également les laminines (Petajaniemi *et al.*, 2002; Sorokin *et al.*, 2000). Il est donc envisageable que le vecteur AAV8 puisse transduire des cellules épithéliales vasculaires via le co-récepteur de la laminine, et permettre ainsi l'expression de l'antigène et sa présentation aux leucocytes via

les molécules du CMH, conduisant au final à l'activation du système immunitaire. En conclusion, afin d'obtenir des réponses immunitaires efficaces, il serait peut être préférable de cibler plusieurs types cellulaires au sein d'un tissu, plutôt que de privilégier la transduction plus efficace d'un seul tissu.

Il est également important de noter que seul le vecteur AAV8 a été injecté chez le hamster, d'autres sérotypes d'AAV devront être testés afin de vérifier que ce vecteur est également le plus efficace pour induire une réponse humorale chez cet animal.

Le sérotype d'AAV utilisé peut également moduler le type de réponse humorale observée. En effet, en analysant les différents isotypes d'IgG spécifiques de la protéine G du virus NiV, nous avons observé que l'AAV1 et l'AAVrh32.33, induisent l'apparition d'IgG de sous-type IgG1 et IgG2a en quantité relativement égale, que ce soit par la voie IM ou ID (Figure 2B de l'article). En revanche, le vecteur AAV8 injecté par voie IM a montré un titre en IgG2a bien supérieur au titre en IgG1, mais cette caractéristique n'a pas été observée par la voie ID. De plus, cette différence a été constatée aussi bien chez la souris que chez le hamster.

Il est important de rappeler que la mise en place d'une réponse immunitaire adaptative face à un antigène, entraîne l'induction de réponses humorale et/ou cellulaire. Les lymphocytes B sont impliqués dans la mise en place de la réponse humorale alors que les lymphocytes T sont responsables de l'immunité cellulaire. Parmi ces derniers, les lymphocytes T CD4⁺ auxiliaires agissent comme des intermédiaires de la réponse immunitaire. En effet, les cellules T CD4⁺ de type Th1 aident à la formation et à la stimulation des LTC, des cellules tueuses naturelles ou « *natural killer* » et des macrophages alors que les cellules T CD4⁺ de type Th2 aident les lymphocytes B à se différencier en plasmocytes (Figure 51). Les cellules de type Th1 sont généralement impliquées dans les luttes contre les pathogènes intracellulaires comme les virus ou les bactéries alors que les cellules de type Th2 sont plutôt impliquées dans la protection contre des pathogènes extracellulaires. Lors du déclenchement d'une réponse immunitaire, une balance s'établit entre la réponse Th1 et Th2 avec souvent l'orientation de cette réponse dans un sens ou dans un autre mais tout en restant interconnectée. Lors de la mise en place d'une réponse cellulaire de type Th1, les cellules CD4⁺ de type Th1 produisent diverses cytokines telles que l'IFN γ , l'IL-2 ou le TNF- α , qui vont aider à la mise en place de la réponse CD8⁺ et permettre aux cellules B de produire des IgG d'isotype IgG2a. En revanche, si une réponse Th2 est privilégiée, les cellules CD4⁺ Th2 produisent des cytokines telles que l'IL-4, l'IL-5, l'IL-10 et l'IL-13, ce qui provoque la transition des anticorps produits par les cellules B en anticorps neutralisants et en IgG1, et permet également de réguler la réponse Th1 (Murphy *et al.*, 2008).

Concernant le vecteur AAV8-NiV.G que nous avons injecté par voie IM, un titre en IgG2a plus important a été obtenu, sous-entendant qu'une réponse de type Th1 est probablement privilégiée. Etant donné que cette tendance n'a été observée qu'avec ce sérotype et qu'avec la voie d'injection IM, il semblerait que le vecteur et la voie d'injection jouent un rôle crucial dans cette orientation alors que la protéine G ne semble pas ou peu impliquée. De plus, l'injection de vecteur Ad codant pour la protéine G du virus NiV a également induit un titre en IgG2a plus important que le titre en IgG1 (Figure 44B).

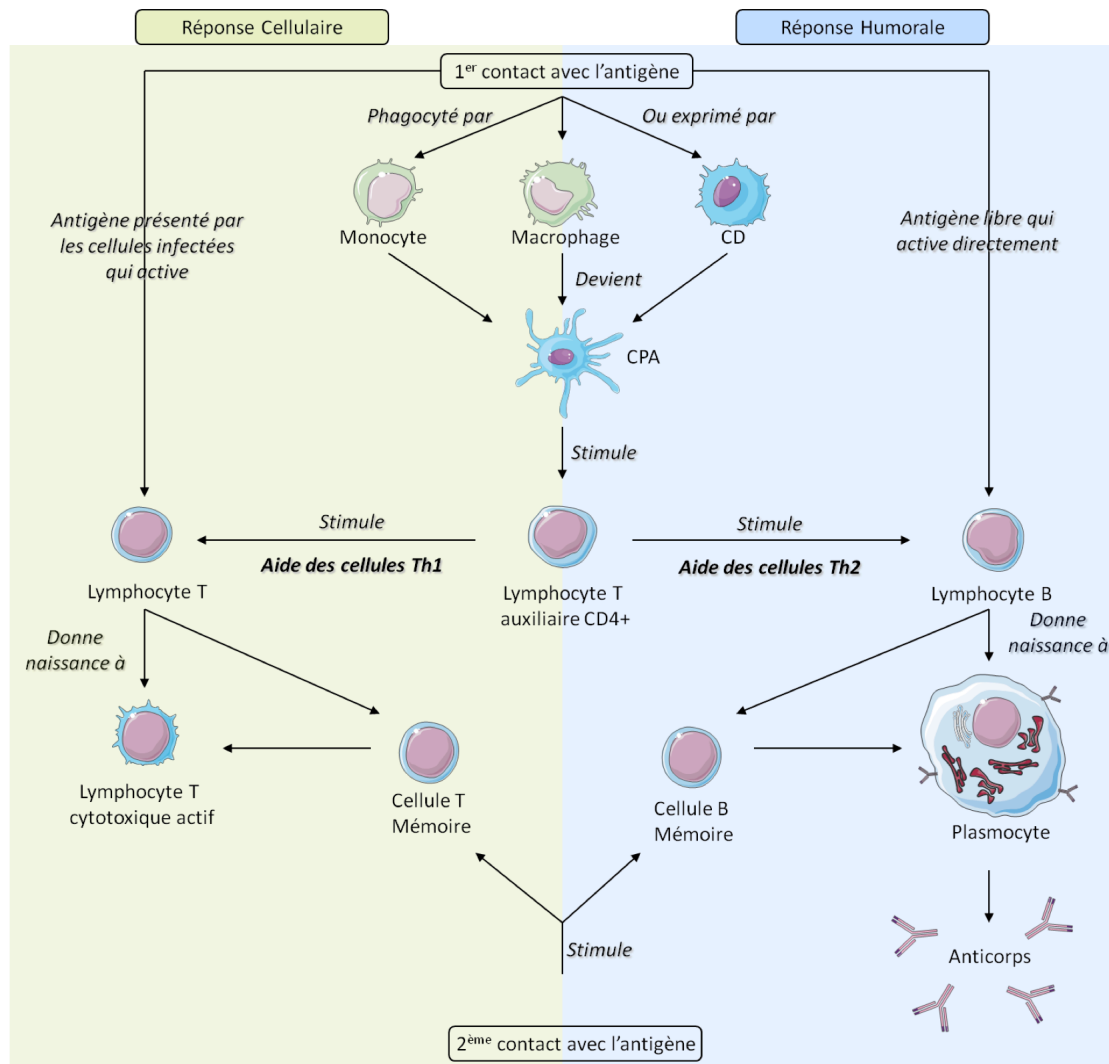


Figure 51. Réponses immunitaires engendrées par la rencontre avec un antigène

Deux types de réactions immunitaires peuvent avoir lieu après la rencontre avec un antigène. L'antigène est phagocyté ou exprimé par les monocytes, les macrophages ou les cellules dendritiques (CD), une fois l'antigène capté, ces cellules deviennent des cellules présentatrices d'antigènes (CPA). Les lymphocytes CD4+ auxiliaires par l'intermédiaire des cellules de type Th1, contribuent à l'activation de la réponse cellulaire, et par l'intermédiaire des cellules de type Th2, activent les lymphocytes. Schéma inspiré de (Campbell and Reece, 2004).

Egalement, la vaccination des porcs par le vecteur ALVAC codant pour la protéine G du virus NiV a mis en évidence que les cellules du sang périphérique produisent, suite à leur restimulation par l'antigène G, beaucoup d'IFN γ , peu de TNF α et une faible quantité d'IL-10 (Weingartl *et al.*, 2006). Ces données sont cohérentes avec la mise en place d'une réponse antivirale Th1 mais le type de vecteur et la voie d'injection peuvent probablement influencer cette tendance de manière plus ou moins prononcée. De plus, les isotypes d'anticorps produits fournissent uniquement une indication sur le type de réponse impliquée mais ne confirment pas ces tendances. La mesure de l'expression des cytokines spécifiques des réponses Th1 et Th2 devrait être réalisée afin de confirmer la mise en place d'une réponse Th1.

2.1.5 Effet de la localisation de l'antigène

La localisation de l'antigène au sein d'une cellule semble jouer un rôle déterminant dans les réponses immunitaires induites. En effet, un vecteur AAVr codant pour une protéine LacZ cytoplasmique ou membranaire ne va pas stimuler les réponses immunitaires de la même façon. Ainsi, la protéine LacZ localisée dans le cytoplasme ne va pas induire de réponse immunitaire alors que la protéine membranaire va être reconnue beaucoup plus efficacement (Sarukhan *et al.*, 2001). De la même façon, un vaccin à ADN permettant l'expression d'une protéine immunogène sécrétée sera plus efficace pour induire une réponse humorale que l'utilisation du même antigène membranaire (Drew, Lightowlers, and Strugnell, 2000). Dans notre étude, le délai d'apparition des réponses humorales ainsi que la quantité d'anticorps produits ont été évalués en comparant le vecteur AAV8 codant pour la protéine G du virus NiV exprimée sous une forme membranaire ou sécrétée. De façon surprenante, après injection en IM chez la souris, l'antigène utilisé sous forme sécrétée n'a pas induit de réponse humorale (Figure 47). Plusieurs raisons peuvent expliquer ce résultat. Tout d'abord, la protéine Gs n'a peut-être pas été produite en assez grande quantité pour être reconnue par le système immunitaire. En effet, une seule dose de 2.10^{10} gp par animal a été évaluée. La réalisation d'une étude de dose-réponse permettrait alors de vérifier ce point. Il est aussi possible que l'induction d'une réponse efficace requiert la co-administration d'un adjuvant. En effet, les essais de vaccination avec de la protéine Gs ont tous été réalisés avec des adjuvants. Enfin, il est possible que la protéine Gs ne soit pas efficacement sécrétée comme cela a d'ailleurs pu être observé *in vitro*, et/ou rapidement recaptée pour être internalisée dans les cellules (voir Résultats, Chapitre 1.2.1). Un dosage de la quantité de Gs présente dans la circulation et dans les cellules musculaires permettrait d'adresser ce dernier point. De plus, la voie IM n'est peut être pas la voie la mieux adaptée pour présenter la protéine Gs efficacement.

2.2 EFFET D'UN RAPPEL SUR LA RÉPONSE HUMORALE

L'utilisation d'une stratégie de primo-injection / rappel utilisant des vecteurs (homologues ou hétérologues) ou d'autres modes de vaccination est généralement utilisée lorsque la première injection de vaccin ne permet pas d'induire une immunité suffisante pour protéger l'individu. En effet, l'objectif d'un vaccin est de permettre le développement d'une immunité humorale et cellulaire contre l'antigène. Dans notre cas, la première injection a été suffisante pour permettre le développement d'une réponse AcN spécifique et stable dans le temps. L'injection d'un vecteur homologue a été réalisée dans un second temps afin de déterminer si la réponse humorale obtenue en première intention pouvait être amplifiée.

2.2.1 Réponse humorale

La seconde injection de vecteur a été réalisée avec un sérotype d'AAVr différent de celui injecté en premier. En effet, après la première injection de vecteur, des AcN se sont développés non seulement contre l'antigène mais également contre la capsid d'AAVr utilisée. Ces anticorps ne peuvent pas neutraliser les autres sérotypes d'AAVr testés (Figure 41). Ainsi, en intervertissant les sérotypes, les capsides d'AAVr injectées en rappel ne risqueront pas d'être neutralisées et leur effet stimulant sur la réponse humorale ne sera pas diminué.

Chez la souris, la réponse humorale induite après la primo-injection a atteint un plateau en IgG et en AcN après la semaine 12 et ce jusqu'à la semaine 16, date à laquelle a été réalisée la seconde injection de vecteurs AAVr (Figure 2A de l'article). Le sérotype AAVrh32.33, capable d'induire à la fois des réponses humorale et cellulaire fortes, a été sélectionné pour cette deuxième injection (Lin *et al.*, 2009). En analysant les réponses IgG ainsi que les titres en AcN obtenus à différents temps après le rappel, nous avons observé une augmentation faible mais non significative du point de vue statistique (Figure 3 de l'article). De plus, la voie d'injection des vecteurs n'a pas eu d'influence sur les réponses immunes induites. Également, les titres en IgG1 et en IgG2a n'ont également pas beaucoup augmenté. Ainsi, le rappel effectué 16 semaines après la première injection de vecteurs AAVr n'a pas permis d'augmenter la réponse humorale observée après la primo-injection.

Un exemple similaire a été décrit dans une étude utilisant des vecteurs AAVr pour exprimer des antigènes du HIV. Dans cette étude l'injection d'un vecteur AAV-HIV par voie IM chez la souris a permis le développement d'une réponse humorale forte et durable dans le temps. Cette réponse IgG a diminué lentement et les animaux ont subi un rappel avec le même vecteur 10 mois après la première injection. Ce rappel a permis de restimuler la

réponse humorale à un niveau identique à celui observé lors de la première injection (Xin *et al.*, 2001b). Ainsi, il est possible que dans notre cas, nous ayons atteint le maximum de la réponse humorale avec cet antigène, et que l'organisme ne puisse pas augmenter cette réponse. Il aurait peut-être été préférable d'attendre que le taux d'anticorps induit par la vaccination chute avant de stimuler à nouveau le système immunitaire.

Par ailleurs, l'absence d'effet du rappel pourrait être due à l'utilisation d'un deuxième vecteur AAVr activant les mêmes voies de signalisation, c'est pourquoi, en restimulant la même voie deux fois de suite, l'effet n'aurait pas davantage été amplifié.

Aucune étude n'a analysé l'effet d'injections multiples d'AAV, sur la réponse humorale. Des données non publiées provenant d'un modèle cobaye utilisé dans notre laboratoire, indiquent que deux injections IM de vecteurs AAVr de sérotypes différents et codant pour des glycoprotéines d'enveloppe du virus HCV sont nécessaires à l'induction d'une réponse humorale détectable. De plus, il s'est avéré que la combinaison de vecteurs AAV8 en première injection puis d'AAVrh32.33 lors de la deuxième injection, a permis le développement d'une réponse humorale plus forte que la combinaison inverse. Cependant, la meilleure combinaison consistait en une première injection avec un vecteur AAVr et un rappel avec un vecteur Ad codant pour les mêmes antigènes. Dans cette dernière configuration la primo-injection avec un vecteur AAVr permet d'accélérer la production d'IgG et d'AcN par rapport à une simple injection avec le vecteur Ad seul (E. Gauthier *et al.*, données non publiées). Ces résultats confirment des données plus anciennes indiquant que chez la souris, la combinaison AAVr + Ad induit de meilleures réponses anticorps que l'injection d'Ad seul ou d'AAVr seul (Lin *et al.*, 2007b). Ils concordent également avec une autre publication décrivant qu'une réponse humorale induite par un vecteur AAV1 peut être stimulée par un rappel d'Ad 3 mois plus tard, (Lin *et al.*, 2007a). Dernier exemple, des macaques injectés par voie IM avec le vecteur AAVrh32.33 et stimulés par un vecteur Ad, 40 semaines après la première injection, permet d'augmenter l'ampleur de la réponse humorale induite contre l'antigène testé (Lin *et al.*, 2009).

Concernant le délai nécessaire requis avant d'effectuer la seconde injection, deux tendances se dégagent : soit les injections de vecteurs AAVr peuvent être répétées à quelques jours ou à quelques semaines d'intervalle, soit la deuxième injection doit être réalisée plusieurs mois après la 1^{ère} injection. À ce jour, aucun protocole ne peut être privilégié dans notre étude, de par la variabilité des résultats observés. De plus, beaucoup d'autres facteurs, comme le modèle animal, la nature de la première immunisation et la voie d'injection semblent influencer ces réponses. Ainsi, afin de mieux comprendre ces mécanismes complexes, des combinaisons de vecteurs AAVr utilisés en primo-injection / rappel devraient ainsi être testées chez la souris. Ces combinaisons devraient inclure l'Ad

codant pour la protéine G du virus NiV qui a été développée au cours de ce travail, tout en faisant varier le délai d'injection du rappel.

Comme expliqué précédemment, très peu d'études de vaccination utilisent le hamster comme modèle animal. Dans notre étude, la réponse humorale a atteint un pic entre la semaine 4 et 6 après l'injection de vecteurs AAV8, puis a chuté jusqu'à la semaine 10. La seconde injection de vecteurs réalisée au cours de la semaine 12, moment où les réponses IgG étaient au plus bas, n'a pas permis de stimuler les réponses anticorps analysées 3 semaines après le rappel. De même, la réponse AcN n'a quant à elle pas été impactée par ce rappel (Figure 48). Comme observé chez la souris, un délai d'attente plus long avant d'effectuer le rappel aurait peut-être dû être respecté afin que la réponse AcN puisse chuter. Les combinaisons AAVr + Ad ; Ad + AAVr ; AAVr seul et Ad seul seraient de plus intéressantes à explorer chez le hamster afin de déterminer la condition la plus efficace pour induire une forte réponse humorale.

2.2.2 Persistance du vecteur dans le temps

Après une injection de vecteurs AAVr, la réponse humorale reste stable dans le temps au moins 16 semaines après l'injection. Une des hypothèses pouvant expliquer la présence permanente d'IgG et d'AcN serait la persistance du vecteur et une expression stable de la protéine G au sein de l'organisme. Comme nous avons pu l'observer, le vecteur AAVr persiste plus longtemps dans l'organisme de la souris que le vecteur Ad (Figure 45A). En effet, le vecteur Ad induit une forte réponse cellulaire qui entraîne la destruction des cellules transduites, provoquant la disparition relativement rapide du vecteur de l'organisme (Dai *et al.*, 1995; Kay *et al.*, 1995; Yang *et al.*, 1994a). Ce délai est cependant suffisant pour induire une forte réponse humorale (Figure 44). Concernant le vecteur contrôle AAV8-GFP, la quantité d'ADN issue du vecteur est stable dans le temps alors qu'il a été montré que la protéine GFP est capable d'induire des réponses immunitaires chez la souris Balb/c (Gambotto *et al.*, 2000; Stripecke *et al.*, 1999). Il semblerait que les réponses cellulaires induites ne soient pas suffisamment efficaces pour détruire les cellules transduites par les vecteurs AAV-GFP. En effet, l'injection de vecteurs AAV-GFP chez la souris conduit au développement de cellules T spécifiques de la protéine GFP capable de sécréter de l'IFN γ , mais aucune évidence n'a été montrée quant à la cytotoxicité de ces cellules et les cellules transduites ont persistés dans le temps (Mays *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007b). Ainsi, nos résultats sont en accord avec ces études montrant une expression persistante de la protéine GFP dans le muscle de la souris injecté par des vecteurs AAVr. Concernant le vecteur AAV8-NiV.G utilisé dans ce travail, la quantité de vecteurs présente dans l'organisme est plus faible qu'avec le vecteur AAV8-GFP mais l'expression reste stable dans le temps. Ce phénomène

est probablement causé par le développement de cellules CD8+ cytotoxiques qui ont commencé à détruire les cellules transduites puis se sont arrêtées de fonctionner. Comme suggéré par deux études récentes, la persistance du vecteur AAV8 pourrait induire l'épuisement des cellules CD8+, qui sont des cellules effectrices capables de détruire les cellules exprimant l'antigène (Lin *et al.*, 2009; Lin *et al.*, 2007a). Dans une étude comparant les vecteurs AAV8 et AAVrh32.33, les ARNm de ces deux vecteurs ont été analysés par qPCR. L'ARNm du vecteur AAV8 a été détecté une quantité beaucoup plus importante et stable que celui spécifique au vecteur AAVrh32.33, preuve d'une absence ou d'une faible réponse cellulaire dirigée contre les cellules transduites. De part les quantités d'ADN et d'ARN viraux observés 16 semaines après injection, la protéine G est probablement encore produite dans le muscle de la souris à ce moment. Ainsi, l'AAV8-NiV.G a persisté dans le temps, malgré la probable mise en place d'une faible réponse cellulaire 4 mois après l'injection. La présence d'ARN NiV.G 4 mois après injection indique que la protéine G a été produite dans l'organisme et a probablement saturé le système immunitaire, rendant la seconde injection de vecteurs AAVrh32.33-NiV.G inefficace. L'analyse de la réponse cellulaire et la mise au point d'un système permettant la détection de la protéine G dans l'organisme permettraient de confirmer ces hypothèses.

Enfin, concernant le hamster, une étude de la persistance du vecteur dans le temps devrait être réalisée afin de mieux comprendre le devenir de ces vecteurs au sein de cet organisme tant au niveau de la quantité d'ADN que de la quantité d'ARN.

3. VACCIN CONTRE LES HÉNIPAVIRUS

Les vecteurs AAV-NiV.G sont capables d'induire le développement d'une réponse humorale composée d'IgG et d'AcN spécifiques de la protéine G du virus NiV. Afin de déterminer si la réponse humorale observée est suffisamment efficace pour protéger les animaux contre une infection par le virus NiV wt, une épreuve virale a été réalisée chez le hamster. De plus, compte-tenu de la grande proximité génétique des virus NiV et HeV, nous avons regardé si les vecteurs AAV-NiV.G pouvaient également protéger les animaux d'une infection par le virus HeV.

3.1 VACCIN CONTRE LE VIRUS NiV

Dans ce projet, des hamsters ont été vaccinés à l'aide de vecteurs AAV8-NiV.G ou AAV8-GFP à une dose de 6.10^{11} gp par animal. Des doses mortelles de virus NiV administrées par voie IP 5 semaines après l'immunisation ont permis de protéger 100 % des animaux

(Figure 6A de l'article). Deux doses de virus NiV ont été administrées, 1 000 pfu et 10 000 pfu. Concernant la dose la plus faible de virus NiV injectée, un animal sur trois du groupe contrôle AAV8-GFP, qui aurait dû développer les signes cliniques de l'infection, n'en a développé aucun et a survécu jusqu'à la fin du protocole. Ce phénomène nous a vivement interpellé puisque la dose létale utilisée dans les publications était de 1 000 pfu et que ce phénomène n'avait jamais été mentionné. La première des hypothèses a remis en cause l'injection du virus. En effet, les expériences ayant été menées en laboratoire P4, il faut un équipement et des précautions particuliers pour réaliser cet acte expérimental, et les injections IP peuvent en pratique se transformer en injections SC. Or, une injection SC de virus NiV n'entraîne pas le développement de la maladie et le virus est directement éliminé de l'organisme (données non publiées). Il faudrait donc utiliser une dose plus importante de virus pour voir un effet.

Une deuxième hypothèse nous paraît en revanche beaucoup plus plausible. En effet, dans les publications détaillant les modèles animaux pouvant reproduire des symptômes similaires à ceux observés chez l'homme, la dose létale entraînant la mort de 50 % des animaux, DL_{50} (dose létale 50 %), avait été évaluée. Dans la littérature et chez le hamster, la DL_{50} de virus NiV injectée par voie IP est de 270 pfu et une injection de 1 000 pfu a induit la mort de 5 animaux sur 6, 4 à 6 jours après l'injection (Wong *et al.*, 2003). De plus, dans l'étude de vaccination et d'évaluation de la protection par le Canarypox, une dose de 1 000 pfu a été utilisée et a entraîné la mort de tous les hamsters contrôles (Guillaume *et al.*, 2004b). Dans notre expérience, malgré le fait que le virus ait été titré avant chaque injection aux animaux, la DL_{50} n'a pas été recalculée. Il est fort probable que la DL_{50} varie d'un stock viral à un autre, et qu'il faille ainsi adapter la dose de virus avant chaque utilisation. C'est pourquoi probablement à cause d'une dose trop faible de virus NiV injectée, 1 animal sur 3 du groupe contrôle a pu survivre à l'infection virale. Par manque de temps, nous n'avons cependant pas pu calculer la DL_{50} sur le stock viral utilisé. C'est pourquoi, afin d'être sûr de se placer dans des conditions optimales, une dose plus forte de virus (10 000 pfu) a été administrée. Il est également important de souligner que toutes les équipes de recherche parlent de la dose de virus NiV injectée, en DL_{50} ou en $TCID_{50}$ (50 % *tissue culture infective dose*) représentant la dose nécessaire pour induire un effet cytopathique sur 50 % des cellules en culture *in vitro*. La DL_{50} donne une indication beaucoup plus précise et proche de ce qui se passe *in vivo* que la $TCID_{50}$.

Dans notre étude, suite à l'injection de 10 000 pfu de virus NiV par voie IP, les animaux vaccinés ont tous survécu à l'infection. Ces animaux n'ont développé aucun symptôme et le virus n'a entraîné aucun retard dans la prise de poids de ces animaux. Les titres en anticorps spécifiques de la protéine G après l'infection n'ont que légèrement augmenté. Seul l'animal NiV.G-5 qui avait un faible titre en anticorps NiV détectés avant

l'infection (titre de $<1 : 10$ avec le test NiV wt contre $1 : 20$ avec le test VLP-NiV), a montré une augmentation du titre en AcN après l'infection par le virus NiV.

L'analyse des sites majeurs de réplication du virus NiV, effectuée au moment de l'euthanasie des animaux, n'a montré aucune trace d'ARN NiV, que ce soit dans le cerveau, les poumons ou la rate. De plus, l'analyse histochimique des organes n'a montré aucun signe de lésion. En conclusion, l'absence de symptôme, la stagnation des titres en AcN et l'absence de virus dans les organes en fin d'expérimentation indiquent que le virus a été complètement éliminé de l'organisme. Compte tenu de l'augmentation du titre en AcN observée chez l'animal NiV.G-5, nous pensons que le virus a commencé à se répliquer au sein de l'organisme, et que la faible réponse immunitaire mise en place a ensuite permis d'éradiquer complètement le virus. Ce phénomène a également été observé dans une étude réalisée chez le singe, utilisant un vecteur AAV2-SIV pour l'immunisation suivi d'une infection par le virus sauvage SIV, dans laquelle les animaux ont survécu à l'infection malgré la détection d'une réplication virale (Johnson *et al.*, 2005a).

Dans notre étude, dès que le virus est entré dans l'organisme et après qu'il ait effectué une première réplication, le virus s'est disséminé dans l'organisme via la circulation sanguine dans les 4 à 5 jours après l'infection. Dans la première expérience réalisée avec 1 000 pfu de virus NiV, nous avons vérifié la présence de particules de virus NiV circulantes 5 jours après infection, en extrayant l'ARN du virus à partir du sérum des animaux infectés comme réalisé dans la publication de Guillaume *et al.* (Guillaume *et al.*, 2004b). Des particules virales circulantes ont été détectées uniquement chez les contrôles négatifs. Compte-tenu de la faible quantité de virus circulant présente dans le sérum et à cause de la limite de détection des échantillons par qPCR, il est très difficile de détecter ces particules virales circulantes (Wong *et al.*, 2003). En revanche, cette détection pourrait être améliorée en réalisant une RT-qPCR sur l'ARN issu des leucocytes du sang total car le virus NiV semble se fixer à ces leucocytes pour se disséminer dans l'organisme (Mathieu *et al.*, 2011).

Notre étude suggère ainsi qu'une seule injection de vecteurs AAV8-NiV.G serait plus efficace que l'utilisation d'un vecteur VV codant pour ce même antigène, qui nécessite deux injections pour protéger les animaux de l'infection par le NiV malgré des signes évidents de réplication virale (Guillaume *et al.*, 2004b).

Afin de nous assurer que la vaccination par des vecteurs AAVr permet la mise en place d'une immunité stérilisante contre le virus NiV, la réplication virale du virus au cours du temps devrait être évaluée, tout comme la détection d'anticorps anti-NiV dirigés contre d'autres antigènes que la protéine G. En effet, si le virus se réplique et que le système immunitaire le détecte, des anticorps dirigés contre de nombreuses protéines du virus NiV devraient être détectés. Ainsi, nous pourrions discriminer la réponse humorale induite par le

vaccin, de celle induite par le virus. De plus, l'infection par le virus NiV a été réalisée au pic de la réponse IgG et AcN, c'est-à-dire à 5 semaines post-immunisation. Afin d'évaluer plus précisément la protection mise en place par les vecteurs AAVr, il faudrait réaliser cette infection à des temps plus tardifs permettant de mesurer la réponse mémoire, et également, réaliser des injections à des temps plus précoces, pour évaluer la quantité d'anticorps minimale requise pour protéger les animaux.

3.2 VACCIN CONTRE LE VIRUS HeV

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, les virus NiV et HeV possèdent une forte identité de séquence, notamment au niveau de la protéine G. De plus, les études de vaccination suggèrent que la protéine G du virus HeV permet le développement d'AcN dirigés contre les virus NiV et HeV, alors que la protéine G du virus NiV induit des AcN dirigés majoritairement contre le virus NiV, qui n'ont de plus qu'une faible capacité de cross-neutralisation vis-à-vis du virus HeV (Mungall *et al.*, 2006; Weingartl *et al.*, 2006). Cependant, cette dernière observation provient uniquement des tests de séroneutralisation réalisés *in vitro* et non pas d'analyses de protection effectuées *in vivo*.

Ainsi, nous avons voulu vérifier si l'immunité induite par la protéine G du virus NiV pouvait protéger des animaux infectés par le virus HeV. Le même protocole que celui de l'épreuve virale utilisant le virus NiV a été réalisé. Une dose de 10 000 pfu de virus HeV a été injectée par voie IP 5 semaines après immunisation. La moitié des animaux vaccinés ont survécu à cette infection. Contrairement à ce qui a pu être observé pour l'épreuve virale utilisant le virus NiV, l'immunité induite contre le virus HeV n'est que partiellement protectrice. En effet, les animaux survivants ont développé de légers symptômes accompagnés d'une stagnation de leur poids pendant quelques jours avant de retrouver forme et appétit. Seulement un animal sur les trois survivants a eu un titre en AcN fortement augmenté, signe d'une réplication virale. En revanche, 29 jours après infection, l'ARN viral n'a pas été détecté chez ces animaux, preuve que le virus a été éliminé. De plus, aucune lésion n'a été détectée dans le cerveau et les poumons de ces animaux.

Concernant les études futures, les mêmes perspectives que celles décrites précédemment avec le virus NiV peuvent être appliquées au virus HeV. Il serait également intéressant d'essayer d'améliorer cette protection en réalisant un vecteur AAV codant pour la protéine G du virus HeV, avec de multiples injections de vaccin, et en utilisant de l'Ad-NiV.G.

3.3 PERSPECTIVES

L'ensemble de ces résultats sur la protection contre une infection par les Hénipavirus ont été obtenus dans une configuration où les animaux ont été vaccinés 5 semaines avant l'épreuve virale. Nous pouvons nous demander si ce vecteur ne pourrait pas être utilisé à des fins thérapeutiques. Il est cependant important de noter que le temps requis pour induire le développement d'AcN spécifiques du virus dépasse de loin le temps nécessaire au virus pour induire la mort de l'animal. En revanche, les anticorps ainsi développés pourraient être utilisés dans un traitement d'immunothérapie passive, en les injectant chez l'animal et en effectuant une épreuve virale tout en les comparant avec les anticorps développés par Guillaume *et al.*, ou avec l'anticorps humanisé m102.4 (Bossart *et al.*, 2011; Bossart *et al.*, 2009; Guillaume *et al.*, 2004b).

Ce travail a utilisé pour la première fois des vecteurs AAVr comme vecteurs vaccinaux dirigés contre la protéine G du virus NiV chez un modèle hamster. C'est pourquoi, dans le futur, ces vecteurs doivent absolument être comparés aux autres vecteurs viraux déjà développés (VV, ALVAC, VEE, VSV) chez ce même modèle animal. En effet, compte-tenu du faible nombre d'expériences réalisées chez l'animal, de la diversité des modèles décrits et des diverses conditions expérimentales, il est très difficile de comparer nos résultats avec ceux des autres équipes.

Afin de pouvoir appliquer ce mode de vaccination aux animaux naturellement infectés par ces deux virus, il serait important de réaliser l'infection avec les Hénipavirus par la voie naturelle, c'est à dire la voie respiratoire. Pour cela, il serait intéressant d'effectuer une vaccination avec les vecteurs AAVr par voie IN afin d'induire une immunité de la muqueuse respiratoire, mais également de manière systémique. Pour ce faire, des sérotypes d'AAV possédant un tropisme pour les cellules de l'épithélium pulmonaire, comme l'AAV5 ou l'AAV9 devraient donc être utilisés.

Enfin, il serait intéressant de comparer un vecteur AAVr codant pour la protéine G et un vecteur AAVr dont certains épitopes de la protéine G seraient portés directement par la capsid de l'AAV afin d'évaluer la réponse humorale induite. Ces vecteurs pourraient induire une réponse humorale immédiatement après injection dans l'organisme sans attendre que le vecteur ait exprimé l'antigène. En effet, cette technologie est déjà utilisée pour les vecteurs Ad, et les techniques de modifications de la capsid récemment développées, permettent d'envisager la mise au point d'un tel vecteur (Bartel, Schaffer, and Buning, 2011; Krasnykh, Douglas, and van Beusechem, 2000). Le seul facteur limitant est qu'à ce jour nous ne connaissons pas les épitopes les plus immunogènes des protéines G ou F.

4. IMPLICATIONS DES RÉPONSES CELLULAIRES

Ce travail de thèse s'est principalement intéressé à la réponse humorale induite par les vecteurs AAVr et aux capacités protectrices de cette réponse contre une infection virale. Compte tenu des études de vaccination déjà réalisées avec des vecteurs AAVr, il est probable que dans notre étude, une réponse cellulaire dirigée contre la protéine G du virus NiV se soit également développée. Plusieurs indices renforcent cette idée. Chez la souris, l'induction d'une réponse humorale orientée vers une réponse de type Th1 nous indique qu'une réponse cellulaire a probablement été privilégiée, mais un dosage des cytokines serait nécessaire pour confirmer cette tendance. De plus, la quantité de vecteurs AAV8-NiV.G détectée dans le muscle des souris injectées, plus faible que celle du vecteur contrôle, suggère qu'une réponse cellulaire a eu lieu et a détruit une partie des cellules transduites. Chez le hamster, la présence d'un titre en IgG2a plus important que le titre en IgG1 indique également la mise en place d'une réponse cellulaire. De plus, les animaux vaccinés qui n'avaient qu'un faible titre en AcN ont survécu à l'infection par le virus NiV ou le virus HeV, ce qui semble impliquer les réponses cellulaires dans la lutte contre les infections virales par les Hénipavirus. Il est donc critique pour la suite de ces études de pouvoir analyser la part des réponses cellulaires dans l'effet protecteur. En effet, les réponses cellulaires sont très importantes pour lutter et enrayer de nombreuses maladies infectieuses émergentes telles que le virus MV, le HIV, le SIV ou encore le virus Ebola (Genesca, 2011; Stubblefield Park *et al.*, 2011; Warfield and Olinger, 2011). Dans ce contexte il serait intéressant de comparer l'AAV8 à l'AAVrh32.33. En effet, l'AAV8 est capable d'induire des cellules CD8+ fonctionnelles, mais également de les épuiser de par la présence continue de l'antigène en rendant impossible leur différenciation en cellules mémoires. En revanche, l'AAVrh32.33 pourrait se révéler être un meilleur candidat pour induire une protection efficace basée sur des réponses cellulaires cytotoxiques (Lin *et al.*, 2009).

Durant ce travail de thèse, plusieurs outils permettant d'analyser ces réponses cellulaires ont été développés, mais sans succès. En particulier, nous avons essayé à plusieurs reprises d'obtenir des clones cellulaires stables exprimant la protéine G et pouvant être utilisés comme cibles dans des tests de cytotoxicité. Cependant, à plusieurs reprises peu de protéine G a été détectée à la surface cellulaire et aucun clone pur n'a pu être obtenu malgré l'utilisation de trois lignées cellulaires différentes. Ces premières expériences indiquent que des cellules immortalisées exprimant l'antigène G du virus NiV sont difficiles à obtenir peut-être à cause d'un effet toxique dû à l'expression de la protéine. Pour la suite de ces études, il faudra donc privilégier plutôt des cellules n'exprimant pas le récepteur EphrinB2 ou des cellules monocytaires directement issues de l'animal pour les transfecter avec le plasmide d'intérêt ou les infecter par un vecteur viral. Mais tout ceci est une autre histoire....

ANNEXE 1

REVUE PUBLIÉE

Référence revue, il s'agit de la version non éditée du prochain chapitre : Ploquin, A., Büning, H. and Salvetti, A., 2013. Adeno Associate Virus (AAV) Vectors. In: Scherman, D. (ed.), 2013. *Advanced Textbook on Gene Transfer, Gene Therapy and Genetic Pharmacology: Principles, Delivery and Pharmacological and Biomedical Applications of Nucleotide-based Therapies*. London: Imperial College Press. Chapter 10. <http://www.worldscientific.com/worldscibooks/10.1142/p820>

AAV VECTORS FOR IN VIVO GENE TRANSFER

Aurélie Ploquin¹, Hildegard Büning², and Anna Salvetti^{1*}

¹ INSERM U758-Human Virology Unit, Ecole Normale Supérieure de Lyon, 46 Allée d'Italie, 69007 Lyon, France

² Department I of Internal Medicine and Center for Molecular Medicine of Cologne, University of Cologne, Robert-Koch Str. 21, 50931 Cologne, Germany.

*Corresponding author: anna.salvetti@ens-lyon.fr

Among the variety of viral vectors, those derived from the human parvovirus Adeno-Associated Virus (AAV) have emerged as a very efficient tool for *in vivo* gene transfer into a variety of tissues and animal species during the two last decades. The relative simplicity of the organization of the AAV genome and the non-pathogenic property of the parental AAV have greatly contributed to the use of this viral vector among the gene transfer community. However, the limited knowledge of the wild-type (wt) virus compared to other viral vectors has required considerable effort to gain insight into wt AAV biology to be able to improve the AAV vector system for therapy. This review will summarize the most important features of both wt and recombinant AAV (rAAV) to show how the increased understanding of the biology of the virus and vector have enabled rAAV to lead the *in vivo* gene transfer field.

1. Wild-type AAV biology

AAV was discovered in the early 1960s as a contaminant of adenovirus preparations and soon there after classified as a member of the Parvovirus family. Owing to its replication defective phenotype, this virus, initially named “satellite”, defined a new genus within the Parvoviridae, the Dependoviruses. Indeed, further studies have shown that this virus was unable to replicate alone but required the assistance of a helper virus. Beside Adenovirus (Ad), the first helper virus identified and responsible for the term “Adeno-Associated”, other viruses were also shown to be able to mediate the helper effect including members of the

Herpes virus family, Herpes Simplex virus (HSV) or Cytomegalovirus, and Papillomavirus (HPV) (Daya and Berns 2008). This chapter will review the major properties of wt AAV derived from *in vitro* studies and *in vivo* analyses.

1.1 The AAV genome and life cycle

AAV particles are composed of a naked 20-nm capsid that contains a 4.7 kb single-stranded (ss) DNA genome. The viral genome contains two open reading frames, *rep* and *cap*, flanked by 145 bp Inverted Terminal Repeats (ITRs) that serve as origins of DNA replication (Fig.1A). Four Rep proteins are produced from the *rep* gene using two different promoters and splicing patterns. The two major proteins, Rep78 and Rep68, display DNA-binding, endonuclease, and helicase activities that are essential for AAV genome replication. The smaller Rep proteins, Rep52 and Rep40, are involved in packaging viral DNA but they are dispensable for AAV replication (Daya and Berns 2008). The *cap* gene encodes for three structural proteins (VP1/2/3) and one assembly promoting factor (AAP) (Sonntag *et al.* 2010). AAV has a biphasic life cycle that depends upon the presence or not of a helper virus (Fig.1B). When AAV infects a cell in the absence of a helper virus it enters a latent state that is characterized by the persistence of viral DNA in an integrated or episomal form and by the absence of expression of the viral genes. In contrast, in the presence of a helper virus AAV enters a productive phase that is characterized by transcription of the *rep* and *cap* genes, replication of viral DNA, assembly of empty capsids and, finally, packaging of the newly replicated ssDNA genome within the particles (Flotte and Berns 2005). Importantly these steps, including particle assembly and packaging, occur in the nucleus of the cells concomitantly with the replication of the helper virus that is responsible for the cytopathic effect. It is currently unknown if the particles found outside of the cell are an indirect consequence of the cell lysis or they are released through an active process.

1.2 AAV serotypes and variants

From the initially isolated six AAV serotypes five were contaminants of Ad stocks, while AAV5 was isolated from human condylomatous warts. Among these serotypes, AAV2, 3, and 5 are thought to be of human origin whereas AAV1 and 4 appeared to derive from monkeys based on the prevalence of neutralizing antibodies against these particles in these animal species. Interestingly AAV6 was characterized as a hybrid serotype resulting from a recombination between AAV1 and 2. Further on, the capsid sequence of 5 additional serotypes and more than 100 variants were isolated from human and nonhuman primate tissues using a PCR strategy allowing the amplification of a variable *cap* gene region (Gao *et al.* 2002; Gao *et al.* 2004). Therefore, the complete AAV genome is not available for these new serotypes and variants. In addition to these primate serotypes, virus isolates derived

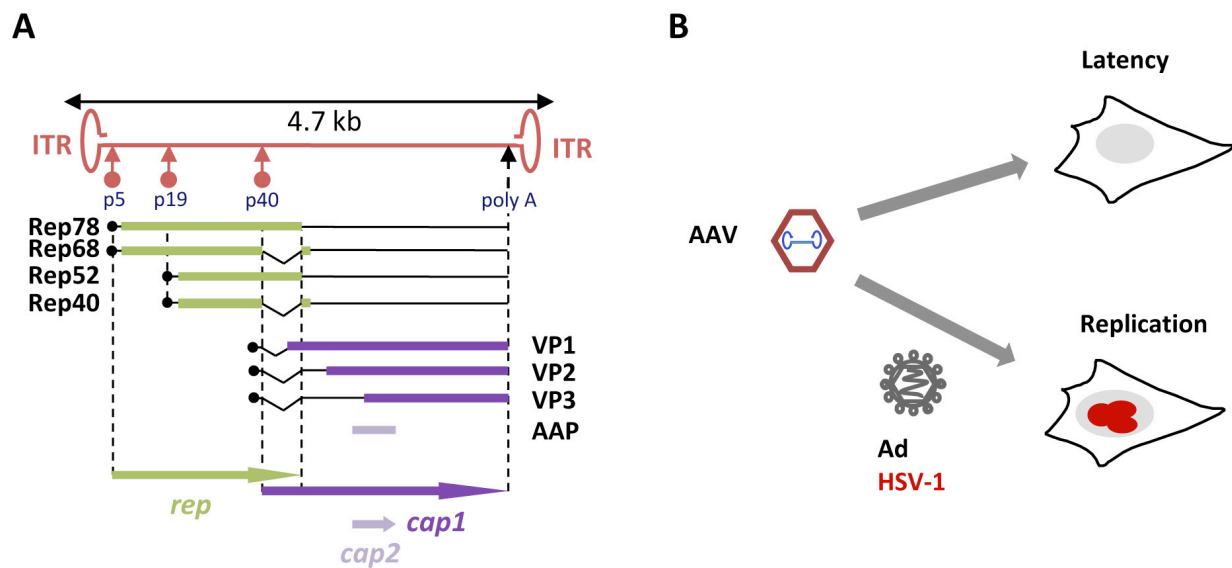


Figure 1.

A. Organization of the wt AAV2 genome. The viral genome is composed by the rep and cap open reading frames flanked by the ITRs. Four Rep proteins are produced from mRNAs initiated at the p5, and p19 promoters, whereas, the three VP proteins and the AAP factors are produced from a mRNA transcribed from the 40 promoter. The ITRs are palindromic sequences that can form T-shaped structures at the end of the ssDNA molecule. **B. AAV life cycle.** In the absence of a helper virus, AAV enters a latent state characterized by the persistence of the viral genome in an episomal or integrated form. In the presence of a helper virus, here Ad or HSV-1, AAV enters a replicative and productive phase that results in the production of infectious particles.

from bovine, avian, and caprine cells were also cloned (Wu *et al.* 2006). Beside their application for rAAV vector production (see §2.2), these studies highlighted two important aspects of wt AAV biology. First, the AAV sequences can be found at a relatively high level in a large proportion of species including humans further confirming epidemiological data showing that a majority of the human population is infected with this virus. Second, AAV sequences can be found in a wide variety of tissues and several variants co-exist within the same individual (Gao *et al.* 2003; Gao *et al.* 2004; Schnepf *et al.* 2005; Schnepf *et al.* 2009). This diversity in terms of tropism and sequence likely reflects the ability of this virus to infect animals through different entry pathways, probably related to the helper virus that accompanies AAV, to spread and recombine within a single individual, and to persist in these tissues. However, it must be noted that it is unclear at the moment if the AAV sequences found *in vivo* truly represent latent AAV genomes that can be rescued upon infection with a helper virus or just a signature of an older infection that cannot be reactivated. As previously noted

by other authors, all these features make AAV a non-pathogenic ubiquitous commensal of mammals (Flotte and Berns 2005).

1.3 Interaction with the host cell

Information on the initial steps of AAV infection including receptor attachment and trafficking to the nucleus has been obtained mostly from studies conducted on AAV2, the best studied AAV serotype. Initial studies identified Heparan Sulphate Proteoglycan (HSPG) as the primary receptor for rAAV2. Several other molecules including the $\alpha v\beta 5$ and $\alpha 5\beta 1$ integrins, the Fibroblasts Growth Factor Receptor- 1 (FGFR1), the hepatocyte growth factor receptor, the 36/67- kDa Laminin Receptor (LamR) and CD9 were further shown to serve as co-receptor molecules. Less information is available for other AAV serotypes except for Platelet-Derived Growth Factor Receptor (PDGFR) for AAV5, LamR for AAV8 and 9, and N- or O-linked sialic acid residues for AAV 4, 5, and 6 (Buning *et al.* 2008). More recently, AAV9, one of the most promising AAV serotypes for gene transfer, was also shown to bind terminal Nlinked galactose residues. The large variety of receptors and/or co-attachment molecules reflects the widespread tropism of most AAV serotypes that like AAV2 are able to transduce nearly any tissue *in vivo* (Bell *et al.* 2011; Shen *et al.* 2011).

Upon engagement with receptor/co-receptor molecules, AAV particles enter the cells using, in most cases, a clathrin-dependent endocytosis pathway and move via a cytoskeleton-driven mechanism toward the nucleus. Endosomal release of the particles into the cytoplasm occurs following a conformational modification of the capsids and results in their accumulation around the nuclear membrane. It is still unclear if entire capsids can enter the nucleus intact or if a partial un-coating is required before nuclear entry (Lux *et al.* 2005; Sonntag *et al.* 2006). After release into the nucleus, the fate of the ssDNA AAV genome, whether it is that of wt or rAAV, includes an essential step converting the ssDNA into a transcriptionally competent double-stranded (ds) DNA molecule. Many studies conducted with rAAV vectors have identified this conversion as a major rate-limiting step that can prevent efficient rAAV transduction *in vitro* and *in vivo* (see §2.2) (McCarty 2008). Further analysis have shown that *in vivo* rAAV genomes are also rapidly circularized forming monomeric or concatemeric episomes that can persist in the nucleus of the cell (Duan *et al.* 1998; Duan *et al.* 1999; Nakai *et al.* 2001; Schnepf *et al.* 2003). However, in contrast to other DNA viruses, rAAV episomes are rapidly lost upon cell division indicating the absence of any mechanism to promote their replication and segregation concomitantly with cellular DNA. Most of these observations that were made using rAAV are likely transposable to wt AAV with two notable differences: 1) wt AAV genes are rapidly repressed in the absence of a helper virus coinfection. This leads to the persistence of transcriptionally silent viral genomes. 2) wt AAV has developed the capacity to site-specifically integrate into a locus of

human chromosome 19 (Smith 2008). This property requires the functional Rep proteins and is probably responsible for maintenance of the wildtype AAV genome in dividing cells. Both episomal and integrated wtAAV genome are transcriptionally silent, but can be re-activated upon infection of the cell with a helper virus leading to a new viral cycle and to the spread of AAV particles.

1.4 Interaction with the helper viruses

To successfully replicate, AAV exploits a helper virus. For historical reasons, most of the studies conducted on the relationship between AAV and its helper viruses initially focused on Ad and the identification of the Ad genes required for the helper effects. Use of diverse Ad strains and individual Ad genes led to the conclusion that only four Ad factors are necessary to induce the helper effect. These are the early protein E1A, required to activate rep gene expression, the E1B(55 kDa) and E4(orf6) proteins and the VA1 RNAs involved in AAV2 RNA transport, stability, and translation, and finally the E2A ssDNA-Binding Protein (ssDBP) that intervenes at the level of AAV DNA replication, gene expression, and translation (Geoffroy and Salvetti 2005). More recently, new functions for these helper factors have emerged including the capacity of the E1B(55 kDa)/E4(orf6) complex to stimulate AAV2 DNA replication by inactivating some cellular DNA repair factors (Stracker *et al.* 2002; Schwartz *et al.* 2007). Altogether these studies have contributed to understand how Ad stimulates the AAV life cycle but also, and most notably, they have led to the development of essential tools for rAAV vector production (see §2.1).

Other studies have focused on the helper activities provided by HSV-1. In particular, recent reports have shown at least nine HSV-1 factors contributing to AAV replication. These include factors like ICP0, ICP4, and ICP22 that stimulate the synthesis of the AAV Rep proteins, and six herpes replication proteins, the UL5/8/52 helicase/primase complex, the ICP8 ssDBP, and the UL30/UL42 polymerase complex that cooperate to induce AAV DNA replication (Alazard-Dany *et al.* 2009).

Altogether these studies indicate that the helper virus helps AAV not only by directly providing some specific factors required for critical steps of the AAV life cycle but also indirectly by rendering the cell permissive for AAV replication. Accordingly, two recent proteomic analyses of the factors recruited by AAV Rep proteins in cells co-infected with Ad or HSV-1 have confirmed that a common pathway of cellular factors contributes to the AAV life cycle (Nash *et al.* 2009; Nicolas *et al.* 2010).

2. Recombinant AAV vectors

Recombinant AAV vectors were developed in the late 1980s and were rapidly demonstrated to possess unique properties for *in vivo* gene transfer. Since their initial development, the field has very rapidly evolved to integrate the progressive knowledge on wt AAV biology towards the development of more efficient vectors. This chapter will summarize the main achievements in the field of rAAV vector technology and use for *in vivo* gene transfer. It will also highlight some recent finding on the interaction of rAAV particles with the immune system.

2.1 Design, production and purification of rAAV particles

Because of its simple genome organization, the design of rAAV vectors is relatively straightforward where the AAV vector genome replaces the *rep* and *cap* gene with a transgene cassette containing the cDNA of choice surrounded by transcriptional regulation elements, i.e. a promoter and a poly-adenylation signal (Fig.2A). The 145-bp long ITRs are the sole viral sequences that are retained *in cis* in the vector genome. Because of probable space constraint imposed by the capsid structure, the size of the transgène cassette is restricted to approximately 4.5 kb. Although possible solutions have been proposed, this property still represents one of the major limitations for the use of these vectors (Daya and Berns 2008). In contrast to their design, the production of rAAV vectors has proven more difficult to optimize. Indeed, as for the wt AAV, the production of infectious rAAV particles requires not only the presence of the *rep* and *cap* gene products but also of the helper virus activities. In addition, because the newly formed particles do not seem to be efficiently secreted by the cells, they have to be purified from cell extracts. Initial studies on the production of rAAV particles involved the use of transformed human kidney cells (293) or the cervix carcinoma cell line HeLa that were transfected with two plasmids containing the rAAV vector backbone and the *rep* and *cap* genes followed by infection of the cells with Ad particles (Fig.2B). rAAV particles were then obtained after purification of the cell extracts on density gradients. However, the helper virus can also replicate and because the density of AAV and Ad are relatively close, this procedure resulted in rAAV stocks that were highly contaminated with Ad particles. Heat inactivation allowed inactivation of infectious Ad particles but did not prevent contamination with Ad-derived proteins or even capsids, thus, preventing a clear evaluation of the potential of rAAV vector *in vivo*. This major hurdle was overcome a few years later by exploiting information available on the helper activities of Ad resulting in the generation of Ad-derived plasmids that contained the Ad genes required for the helper function, but lacked information of structural Ad proteins and, thus, prevented generation of infectious Ad particles. Current methods for small scale rAAV production are based on the cotransfection of cells with two or three plasmids that provide the sequences

of the rAAV vector, the *rep* and *cap* genes, and the Ad helper functions (Fig. 2B). Further development or variations from this standard protocol use helper activities from other viruses (Ayuso *et al.* 2010). This includes for example the use of replication defective HSV or baculovirus vectors, which encode all required information for the production of rAAV vectors and introduction into the cells by infection. These latter methods that circumvent the transfection step greatly facilitate the establishment of large-scale rAAV production. Additional improvements include using stable packaging cell lines that can provide *in trans* the *rep* and *cap* gene products (Thorne *et al.* 2009). Last, but not least, several improvements and/or modifications have been introduced in the purification procedure. These include the use of chromatography procedures that are easily scalable and result in a high level of purity (Ayuso *et al.* 2010).

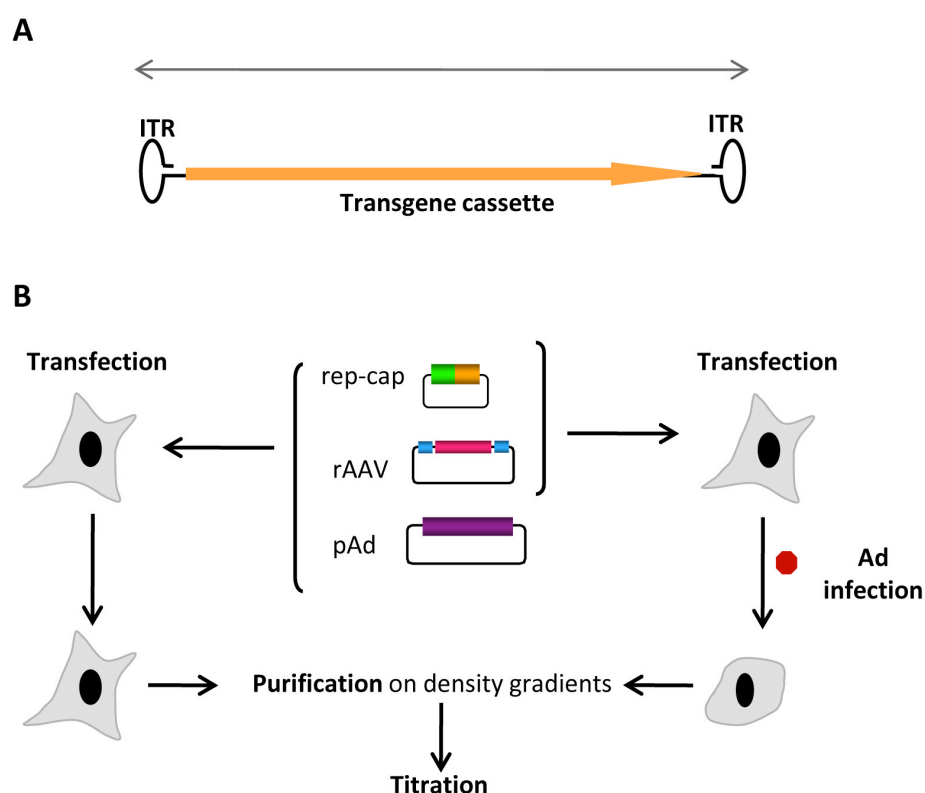


Figure 2.

A. Structure of a rAAV vector genome. Recombinant vectors are obtained by replacing the *rep* and *cap* gene by a transgene cassette that includes a promoter, a cDNA, and a polyadenylation signal. The ITRs are the only viral sequences retained within the vector. **B. Production of rAAV vectors using Ad helper functions.** rAAV vectors can be produced using two different procedures that involve the use of either infectious Ad particles (on the right) or Ad-plasmids containing the minimal Ad helper genes (on the left). In both situations, the rAAV vector and the *rep* and *cap* open reading frames are introduced into the cells by transient transfection. rAAV particles are then purified from cell lysates e.g. by density gradient centrifugation (Salveti *et al.* 1998).

2.2 Use of rAAV vector for gene transfer and gene therapy in animal models.

Initial *in vivo* evaluation of the efficiency of rAAV vectors were mostly performed in mice using vectors derived from AAV2 and encoding for a reporter gene such as β -galactosidase or green fluorescent protein (GFP). Surprisingly, these studies demonstrated that a single injection of rAAV vectors in tissues such as muscle resulted in a high and sustained transgene expression that could last life-long. This observation contrasted strikingly with previous experience of *in vivo* gene transfer using Ad-derived vectors that resulted in a strong but transient expression. Loss of Ad-mediated transgene expression is caused by an immune response against the transduced cells. Further analyses confirmed the ability of rAAV vectors to sustain a stable transgene expression *in vivo* and, also, to efficiently transduce a variety of highly relevant clinically tissues such as liver, central nervous system (CNS), and retina. These initial studies rapidly prompted the use of rAAV vectors in animal models of genetic diseases to validate their potential for gene therapy. Indeed, several studies were performed not only in mice but also in larger animal models such as dogs and non-human primates. Evidence for partial or complete therapeutic efficiency in animal models were obtained for many diseases: haemophilia B, lysosomal storage diseases, congenital inherited forms of blindness, and acquired neurological disorders are some examples of clinical applications of rAAV vectors (Daya and Berns 2008).

The detailed analysis of rAAV-mediated *in vivo* gene transfer has also fostered the improvement of vector design. Notably, efforts have focused on the improvement and/or modification of the tropism of the AAV particles. This was achieved using two non-exclusive strategies: the first involved the replacement of the original AAV2 capsid with that derived from other available AAV serotypes. The evaluation of these new serotypes has rapidly demonstrated that although all serotypes can transduce nearly all tissues they individually possess specific preferences for some cell types (Wu *et al.* 2006). This has rapidly led to the identification of the optimal serotype to be used in a given tissue. Production of rAAV vectors from alternative serotypes can be easily achieved by replacing the AAV2 *cap* gene present in the rep-cap plasmid construct with the homologous sequence derived from any other AAV serotypes leading to the production of pseudotyped particles containing an AAV2-derived vector genome packaged into a capsid derived from different serotypes. The second strategy employed to modify the vector tropism consists of the genetic modification of some capsid residues to redirect the particles to a specific receptor or cell type (Buning *et al.* 2008).

The *in vivo* evaluation of rAAV vectors has also led to the development of modified vector backbones to improve the kinetics and/or the efficiency of transgene expression. The most impressive improvement was brought about by the development of double stranded (ds)

rAAV vectors. As indicated above, several observations had led to the conclusion that conversion of the ssDNA vector molecule, delivered into the nucleus by the AAV particle, into a ds form was a major limiting step for efficient transduction of several tissues (see chapter §1.2). To overcome this barrier, a strategy was developed to produce AAV capsids containing ds DNA vector molecules. *In vivo* evaluation of these dsAAV vectors, also called self-complementary vectors (scAAV), confirmed that the delivery of a ds DNA molecule can generally improve both the kinetics and the efficiency of transduction (McCarty 2008). However, the major is that the size of the vector is two times smaller than that of ssAAV genomes, thus limiting the application of these vectors to small transgenes cassettes (<2.5 kb).

2.3 Use of rAAV vectors in clinical trials.

Experience with rAAV vectors rapidly demonstrated that these vectors are very efficient tools for *in vivo* transduction of post-mitotic tissues in particular liver, muscle, and the central nervous system. Translation into clinical trials emerged from studies conducted in small and large animal models (Mingozi and High 2011). Up until now, approximately 80 clinical trials have been conducted or are still underway using rAAV vectors (<http://www.wiley.com/legacy/wileychi/genmed/clinical/>) in both inherited and acquired diseases. Three major observations can be made on the basis of this list: the first is that in nearly all these trials rAAV vectors were directly injected *in vivo*; they are only rarely used in *ex-vivo* protocols in contrast to other vectors such as lentiviral vectors. The reason for this is that rAAV vectors remain mainly in an episomal form that is stable in differentiated post-mitotic cells but is lost upon cell division. The second observation is the wide variety of tissues that were targeted for transduction. Finally, even though the initial trials were conducted with AAV2-derived vectors, other more efficient AAV serotypes, such as AAV8 or AAV1, are now replacing them.

rAAV vectors so far have demonstrated an excellent safety profile and therapeutic efficacy was reported following local *in vivo* application of rAAV vectors in particular for the treatment of Leber Congenital Amaurosis (LCA), Lipoproteinlipase (LPL) deficiency, and Hemophilia B (Mingozi and High 2011). For patients suffering from LCA, a retinal degenerative disorder due to a defect in the *RPE65* gene that leads to the early onset of blindness, three clinical trials were simultaneously initiated in the United States and in the United Kingdom. In all three trials, rAAV2 vectors encoding for a functional version of the RPE65 protein were injected subretinally in one eye. Increasing brightness in the injected eye was reported to begin two weeks after treatment (High 2009). In addition, psychophysical and measurable improvements in visual function were observed in all three trials. Based on these promising results, further studies are being initiated that will include

younger patients in which the disease is less advanced. The second major success was recently obtained in Hemophilia B patients. The treatment of this disease using rAAV vectors first was initiated more than ten years ago with a clinical trial developed in the United States and involved the intra-muscular injection of rAAV2 vectors encoding for the blood coagulation Factor IX (Matrai *et al.* 2010). In those studies, encouraging results were reported in terms of vector persistence and absence of toxicity, however, with no evidence of therapeutic effect due to a limitation in the vector doses that could be injected in the patients. In animal studies, a 10-100 fold higher therapeutic efficacy was observed following liver compared to muscle injection, most likely due to higher protein secretion capacity. Furthermore, rAAV-mediated expression of transgenes in liver seemed to induce tolerance towards the transgene product (High 2009). Consequently, further studies focused on the intra-hepatic injection of the rAAV2 vectors. Initially, therapeutic levels of Factor IX expression were reported in a patient of the high dose cohort. However, the circulating levels of Factor IX of 10-12% declined to baseline levels by week 10. This decline was accompanied by an asymptomatic rise in liver transaminases first measured four weeks post vector injection. To decipher the cause that initiated the loss of transgene expression, detailed immunological investigations were initiated. Currently, the most likely explanation is a re-activation of memory T cells directed against the viral capsid. More recently a positive outcome was finally reached by introducing substantial modifications in the protocol including a change of serotype (from rAAV2 to rAAV8) and vector genome conformation (from ss to sc) in order to increase the transduction efficacy and, thereby, reduce the vectors dose required. This latter trial that is still ongoing has reported thus far a stable therapeutic level of Factor IX (Nathwani *et al.* Xth Annual congress of the SFTCG, 2011).

In contrast to the Factor IX experience, the clinical trial on inherited LPL deficiency was begun with a non-serotype 2 vector (Gaudet *et al.* 2010). Patients with from LPL deficiency, a rare autosomal-recessive disorder that causes accumulation of triglyceride-rich lipoproteins in the blood, received a rAAV1 vector encoding for a gain of function variant of LPL (Glybera®) by intramuscular injection. Clinical benefit as indicated by a decrease in triglyceride level and frequency of pancreatitis was reported. However, also in this trial activation of T cell response towards the AAV capsid was observed revealing that the use of an alternative serotype may not be sufficient to avoid induction of a cytotoxic T cell response.

2.4 Major limitations and future directions

Altogether pre-clinical and clinical trials in patients have clearly demonstrated the great potential of rAAV vectors. Nevertheless, there is still room for improvement. Currently, researchers focus on the problem of pre-existing and *de novo* induced immune response

against the viral vector particles. Humans are frequently infected by AAV during childhood. The induced adaptive immune response is a considerable obstacle that hampers the efficiency of rAAV transduction *in vivo*. In particular, pre-existing neutralizing antibodies against AAV particles prevent initial cell transduction. In addition, as already discussed, T cell responses towards the capsid are believed to be responsible for the decline of therapeutic efficacy due to destruction of transduced cells. Therefore, besides including an immune suppressive regime, an impressive amount of research is ongoing to identify the origin of the capsid-specific T cell epitopes that are presented on MHC molecules on transduced cells. In addition, at least three strategies have already been developed to deal with the problem of pre-existing neutralizing antibodies: 1) serotype switch; 2) genetic modifications of epitopes; and 3) mosaic capsids (Buning *et al.* 2008). The serotype switch strategy uses capsids of an alternative serotype not, or significantly less efficiently, neutralized by a given serum. While this strategy worked well in animal studies, the value for clinical application remains to be proven since existence of cross-reactive antibodies has been observed in patient sera. Furthermore, this strategy is restricted by the serotype-specific variations in tissue tropism. Modification of antibody epitopes by rational design or by *in vitro* evolution, the second strategy that has been successfully exploited, does not affect vector tropism. However, the immune escape phenotype of currently available mutants is still notably less efficient than that achieved by a serotype switch. The third strategy is also based on a combined approach. In particular, the capsid open reading frames of a set of AAV serotypes is fragmented by enzymatic digest and combined e.g. by PCR. Thereby, a library of virions with mosaic capsids is generated (following packaging), which is screened for infectivity in the presence of neutralizing antibodies. Mutants selected by this approach showed an impressive immune escape phenotype, but their tropism remains to be fully characterized.

Off-target transduction is a further limitation caused by the broad tropism of rAAV vectors and by specific uptake of vectors e.g. in the liver. Cell surface transcriptional as well as post-transcriptional targeting strategies have been developed to circumvent this limitation. Cell surface targeting strategies aim to restrict the vector tropism to a receptor of choice by genetic or non-genetic modification of the viral capsid. While this strategy targets the vector entry step, transcriptional and post-transcriptional targeting restricts the transgene expression and production, respectively. Briefly, by using cell-type specific promoters, transgene expression can be limited to the tissue of choice while incorporation of microRNA target sites avoids transgene production in off-target cells. Combination of the different targeting strategies is possible and is likely to increase the specificity of *in vivo* gene transfer.

A further limitation concerns the high doses of vector that have to be administered to achieve a therapeutic effect. Indeed, doses of approximately 10^{12} vector particles per kg were required in the initial Hemophilia B trials using rAAV2 vectors. Even if lower doses were

used in the latter AAV8 trials, the amount of particles delivered as a single injection in patients still remains impressively high. This is also the case for subretinal injection if one considers that the vector particles remains sequestered in a very small zone of the retina. Besides the challenge of producing high particle numbers, application of high vector doses increases the risk of inducing immune responses and of off-target transduction. Hence, efforts are focused on improving transduction efficiencies by identifying barriers towards AAV transduction followed by introduction of specific modifications. Successful examples are the development of self-complementary vector genomes (see above), mutation of exposed tyrosine residues on the capsid surface to avoid capsid degradation, and introduction of peptide ligands (cell surface targeting) to enable transduction of cell types that lack AAV receptors.

All the efforts discussed above will likely result in a considerable refinement of the AAV vector tool and in the precise identification of the most suitable conditions to achieve efficient gene transfer and a successful therapeutic outcome.

Bibliography

- Alazard-Dany, N., Nicolas, A., Ploquin, A., Strasser, R., Greco, A., Epstein, A. L., Fraefel, C. and Salvetti, A. (2009). Definition of herpes simplex virus type 1 helper activities for adeno-associated virus early replication events. *PLoS Pathog* 5, pp.e1000340.
- Ayuso, E., Mingozi, F. and Bosch, F. (2010). Production, purification and characterization of adenoassociated vectors. *Curr Gene Ther* 10, pp.423-436.
- Bell, C. L., Vandenberghe, L. H., Bell, P., Limberis, M. P., Gao, G. P., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M. and Wilson, J. M. (2011). The AAV9 receptor and its modification to improve in vivo lung gene transfer in mice. *J Clin Invest* 121, pp.2427-2435.
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadts-Humme, S. and Hallek, M. (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* 10, pp.717-733.
- Daya, S. and Berns, K. I. (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* 21, pp.583-593.
- Duan, D., Sharma, P., Dudus, L., Zhang, Y., Sanlioglu, S., Yan, Z., Yue, Y., Ye, Y., Lester, R., Yang, J., Fisher, K. J. and Engelhardt, J. F. (1999). Formation of adeno-associated virus circular genomes is differentially regulated by adenovirus E4 ORF6 and E2a gene expression. *J Virol* 73, pp.161-169.
- Duan, D., Sharma, P., Yang, J., Yue, Y., Dudus, L., Zhang, Y., Fisher, K. J. and Engelhardt, J. F. (1998). Circular intermediates of recombinant adeno-associated virus have defined structural characteristics responsible for long-term episomal persistence in muscle tissue. *J Virol* 72, pp.8568-8577.
- Flotte, T. R. and Berns, K. I. (2005). Adeno-Associated Virus: a ubiquitous commensal of mammals. *Hum. Gene Ther.* 16, pp.401-407.

- Gao, G., Alvira, M. R., Somanathan, S., Lu, Y., Vandenberghe, L. H., Rux, J. J., Calcedo, R., Sanmiguel, J., Abbas, Z. and Wilson, J. M. (2003). Adeno-associated viruses undergo substantial evolution in primates during natural infection. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 100, pp.6081-6086.
- Gao, G., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J. and Wilson, J. M. (2002). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 99, pp.11854-11859.
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., Alvira, M. R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X. and Wilson, J. M. (2004). Clades of Adeno-Associated viruses are widely disseminated in human tissues. J Virol 78, pp.6381-6388.
- Gaudet, D., de Wal, J., Tremblay, K., Dery, S., van Deventer, S., Freidig, A., Brisson, D. and Methot, J. (2010). Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. Atheroscler Suppl 11, pp.55-60.11
- Geoffroy, M. C. and Salvetti, A. (2005). Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. Curr. Gene Ther. 5, pp.265-271.
- High, K. A. (2009). The Jeremiah Metzger Lecture: gene therapy for inherited disorders: from Christmas disease to Leber's amaurosis. Trans Am Clin Climatol Assoc 120, pp.331-359.
- Lux, K., Goerlitz, N., Schlemminger, S., Perabo, L., Golnau, D., Endell, J., Leike, K., Kofler, D. M., Finke, S., Hallek, M. and Büning, H. (2005). Green fluorescent protein-tagged adeno-associated virus particles allow the study of cytosolic and nuclear trafficking. J Virol 79, pp.11776-11787.
- Matrai, J., Chuah, M. K. and VandenDriessche, T. (2010). Preclinical and clinical progress in hemophilia gene therapy. Curr Opin Hematol 17, pp.387-392.
- McCarty, D. M. (2008). Self-complementary AAV vectors; advances and applications. Mol Ther 16, pp.1648-1656.
- Mingozzi, F. and High, K. A. (2011). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. Nat Rev Genet 12, pp.341-355.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L. and Kay, M. A. (2001). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. J Virol 75, pp.6969-6976.
- Nash, K., Chen, W., Salganik, M. and Muzyczka, N. (2009). Identification of cellular proteins that interact with the adeno-associated virus rep protein. J Virol 83, pp.454-469.
- Nicolas, A., Alazard-Dany, N., Biollay, C., Arata, L., Jolinon, N., Kuhn, L., Ferro, M., Weller, S. K., Epstein, A. L., Salvetti, A. and Greco, A. (2010). Identification of rep-associated factors in herpes simplex virus type 1-induced adeno-associated virus type 2 replication compartments. J Virol 84, pp.8871-8887.
- Salvetti, A., Orève, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J. and Moullier, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. Hum. Gene Ther. 9, pp.695-706.
- Schnepp, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A. and Johnson, P. R. (2003). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. J Virol 77, pp.3495-3504.
- Schnepp, B. C., Jensen, R. L., Chen, C. L., Johnson, P. R. and Clark, K. R. (2005). Characterization of adeno-associated virus genomes isolated from human tissues. J Virol 79, pp.14793-14803.

- Schnepp, B. C., Jensen, R. L., Clark, K. R. and Johnson, P. R. (2009). Infectious molecular clones of adeno-associated virus isolated directly from human tissues. *J Virol* 83, pp.1456-1464.
- Schwartz, R. A., Palacios, J. A., Cassell, G. D., Adam, S., Giacca, M. and Weitzman, M. D. (2007). The Mre11/Rad50/Nbs1 complex limits adeno-associated virus transduction and replication. *J Virol* 81, pp.12936-12945.
- Shen, S., Bryant, K. D., Brown, S. M., Randell, S. H. and Asokan, A. (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* 286, pp.13532-13540.
- Smith, R. H. (2008). Adeno-associated virus integration: virus versus vector. *Gene Ther* 15, pp.817-822.
- Sonntag, F., Bleker, S., Leuchs, B., Fischer, R. and Kleinschmidt, J. A. (2006). Adeno-associated virus type 2 capsids with externalized VP1/VP2 trafficking domains are generated prior to passage through the cytoplasm and are maintained until uncoating occurs in the nucleus. *J Virol* 80, pp.11040-11054.
- Sonntag, F., Schmidt, K. and Kleinschmidt, J. A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, pp.10220-10225.
- Stracker, T. H., Carson, C. T. and Weitzman, M. D. (2002). Adenovirus oncoproteins inactivate the Mre11- Rad50-NBS1 DNA repair complex. *Nature* 418, pp.348-352.
- Thorne, B. A., Takeya, R. K. and Peluso, R. W. (2009). Manufacturing recombinant adeno-associated viral vectors from producer cell clones. *Hum Gene Ther* 20, pp.707-714.
- Wu, Z., Asokan, A. and Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* 14, pp.316-327.

ANNEXE 2

MATÉRIELS ET MÉTHODES SUPPLÉMENTAIRES

Lignées cellulaires utilisées

Les cellules 293SZ ou HEK-293 (ATCC CRL-1573) sont des cellules épithéliales humaines de rein. Les cellules 293T ou HEK-293T (ATCC CRL-11268) sont des 293SZ exprimant l'antigène T du virus SV40. Les cellules HeLa (ATCC CCL-2) sont des cellules épithéliales humaines provenant d'un cancer du col de l'utérus. Les cellules TE₆₇₁ (ATCC CRL-8805) sont des cellules humaines dérivées d'un médulloblastome. Les cellules Véro (ATCC CCL-81) sont des fibroblastes de rein provenant de singes vert africains.

Virus utilisés

Le virus Nipah a été isolé à partir d'une souche Malaisienne (isolat UMMC1, Genbank AY029767). Le virus Hendra a été obtenu par le laboratoire de Porton Down en Angleterre. Ces virus détenus au sein du laboratoire P4 de Jean Mérieux INSERM à Lyon ont été obtenus après passage sur cellules Vero.

L'Adénovirus délétaire pour la réplication (Ad-dl324) ne possède plus les gènes *E1* et *E2* et a été utilisé comme virus auxiliaire pour stimuler l'expression des vecteurs AAVr. Ce virus a été fourni par l'Unité AFM/INSERM U649 de Nantes à un titre de $1,1 \cdot 10^{11}$ particules infectieuses (pi/mL).

Plasmides

Les plasmides phCMV-NiV.G et phCMV-NiV.F nous ont été fournis par R.Buckland (INSERM U758). Les plasmides pAAV-GFP et pAAVRF ont été construits au sein du laboratoire. Le plasmide pAAVRF code pour les 4 protéines Rep dont les Rep78 et 68 sont fusionnées à une étiquette Flag. Le plasmide pAAV-mSEAP a été obtenu par A.Galy (Généthon, Paris).

Culture cellulaire

Les cellules sont cultivées et maintenues en milieu de culture Eagle de type Dulbecco ou DMEM (« Dulbecco's Modified Eagle Medium ») contenant 4,5 g/l de glucose supplémenté par 10 % de sérum de veau fœtal (SVF) et 1 % de pénicilline-streptomycine (PS, 5000 U/mL). Les cellules sont maintenues à 37°C sous 5 % de CO₂.

Pour la production de protéine Gs, après transfection de cellules par le plasmide phCMV-NiV.Gs, le milieu de culture est remplacé par du milieu modifié ou du milieu minimal

essentiel de Eagle ou Opti-MEM («modification of Eagle's minimal essential medium») qui est un milieu pauvre en sérum supplémenté par 1 % de PS (5000 U/mL).

Transfection cellulaire

Les cellules sont transfectées par du phosphate de calcium. Les cellules sont ensemencées en plaque 6 puits et 2 µg de chaque plasmide sont utilisés. Pour les cellules ensemencées en plaques de 24 puits, 0,5 µg de chaque plasmide est utilisé. Après transfection, excepté pour la production de protéine Gs, le milieu de culture est remplacé par un milieu DMEM contenant 2 g/l de glucose, 5 % SVF et 1 % de PS. 48 h plus tard, les cellules sont récoltées et lysées.

Immunofluorescence

Des cellules 293SZ cultivées sur des lames de verre ont été fixées par une solution de fixation (PBS, 4 % paraformaldhyde, pH 7.4) pendant 10 min, puis incubées dans une solution de saturation (PBS, 0,1 % Tween20, 5 % BSA) pendant 1 h à température ambiante. L'anticorps NiV GIP 1.7 (ascite anti-NiV.G) a été dilué au 1/1 000 dans du PBS, 0,1 % Tween20, 1 % BSA et déposé sur les cellules pendant 45 min à température ambiante. L'anticorps secondaire anti-IgG de souris, couplé au fluorochrome Alexa-488 (*Life Technologies*) a été dilué au 1/2 000 dans du PBS, 0,1 % Tween20, 1 % BSA et incubé sur les cellules pendant 30 min à température ambiante dans une chambre noire. Les noyaux des cellules ont ensuite été marqués par un intercalant d'ADN TOPRO-3 (*Molecular Probes*) dilué au 1/1 000 dans du PBS pendant 30 min à température ambiante dans une chambre noire. Entre chacune de ces étapes, les cellules sont lavées par deux bains successifs de PBS, 0,1 % Tween20, 1 % BSA. Après le dernier lavage, les lames de verres sont scellées avec une solution de Fluoromount-G (*Southern Biotech*) et stockées à -20°C.

Production des vecteurs AAV-NiV.G

Après validation *in vitro* du plasmide pAAV-NiV.G, l'étape de production des particules virales a été réalisée (Figure 52). Très rapidement, des cellules 293SZ possédant le gène *E1* de l'Ad ont été transfectées par différents plasmides :

- Le plasmide AAVr qui possède la cassette d'expression avec le transgène d'intérêt entouré par les séquences ITR nécessaires notamment pour l'encapsulation de cette séquence dans la particule virale.

- Un plasmide auxiliaire qui possède le gène *rep* permettant la production des protéines nécessaires à la réplication, le gène *cap* du sérotype choisit et enfin les gènes auxiliaires de l'Ad (*E2*, *E4* et *VA*) nécessaires pour la réplication de l'AAV. Parfois, ce dernier plasmide peut être remplacé par deux plasmides, le plasmide pXX6 qui porte exclusivement les gènes de l'Ad et un autre plasmide qui porte le gène *rep* et le gène *cap* d'intérêt.

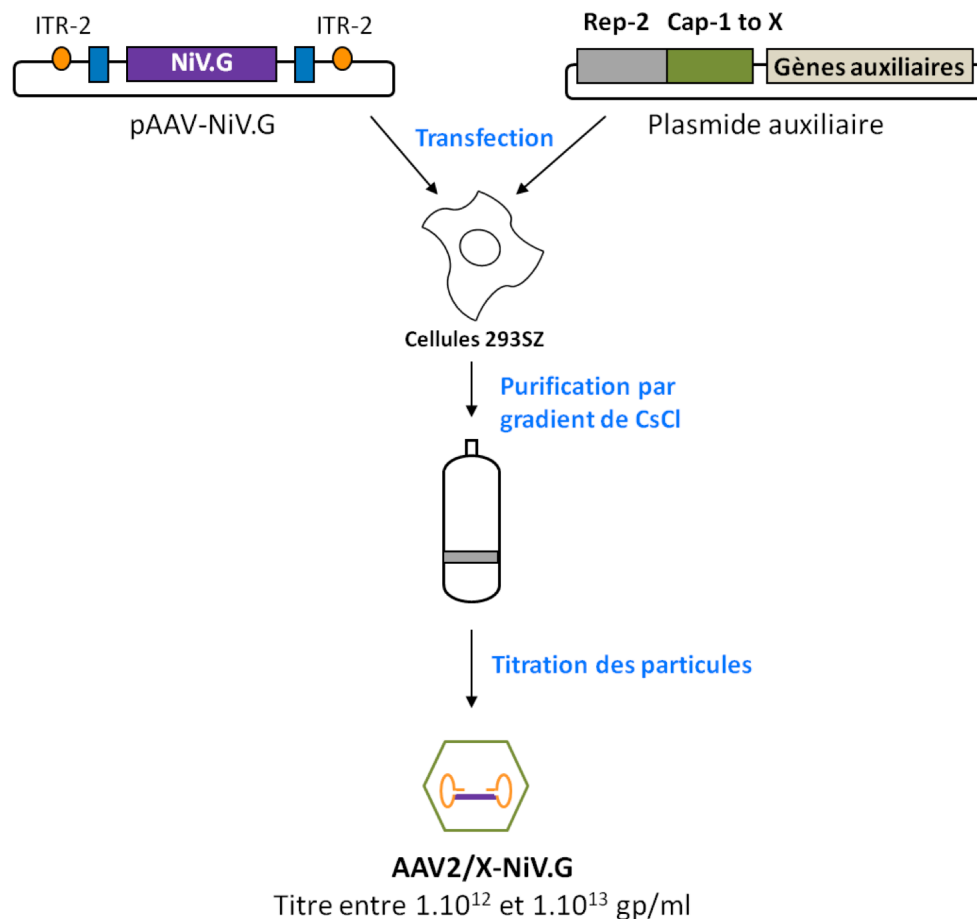


Figure 52. Production des vecteurs AAV-NiV.G

Les cellules sont récoltées 48h plus tard après transfection. Les culots cellulaires sont repris dans du tampon de lyse puis les cellules sont lysées par trois cycles de congélation-décongélation successives. Les particules virales sont purifiées par deux gradients de densités successifs utilisant du Chlorure de Césium (CsCl). Les particules d'AAV possédant le génome recombinant (particules physiquement pleines) ont une densité comprise entre 1,36 et 1,45 g/cm³, mais la densité varie légèrement pour chaque sérotype utilisé. Après élimination du CsCl par dialyse, les particules d'AAVr sont titrées par Dot Blot et par qPCR en

utilisant une gamme de plasmide. Les titres des particules d'AAVr sont donnés en particules de génome ou gp par millilitre.

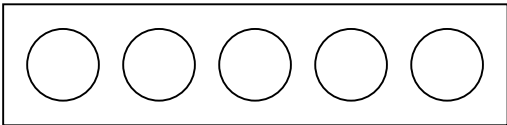
Les particules de vecteurs AAVr produites avec un gène de capside autre que le sérotype 2 sont notées comme suit AAV2/X-NiV.G où le chiffre 2 représente le sérotype 2 du gène *rep* et des ITR et où le chiffre X représente le sérotype de la capside utilisée.

Purification et concentration de la protéine Gs

(Résultats partie 1.2.1)

Appareil Biosprint (Qiagen) utilisant des billes magnétiques Ni-NTA

Il s'agit d'un robot automatique qui transporte les billes magnétiques d'un puits à l'autre suivant un programme prédéfini (agitation, temps incubation). Le puits N°1 (schéma ci dessous) est utilisé pour incuber le surnageant (1,5 mL) contenant la protéine Gs avec les billes de Ni-NTA (50 µl). Les puits N°2 et 3 contiennent 500 µl de solution de lavage (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 0.05 % Tween 20, pH 8). Les puits N°4 et 5 contiennent 50 µl de solution d'élution (50 mM NaH₂PO₄, 300 mM NaCl, 50 mM imidazole, 0.05 % Tween 20, pH 8).



Les échantillons sont notés comme suit : SA : surnageant avant contact avec les billes ; SP : surnageant après contact avec les billes ; L1 : lavage N°1 ; L2 : lavage N°2 ; E1 : élution N°1 ; E2 : élution N°2. Un volume de chaque échantillon a été déposé et analysé par WB, les volumes des différentes fractions sont notés dans le tableau ci-joint. Chaque fraction a été conservée à -20°C.

Biosprint / nom des échantillons	SA	SP	L1	L2	E1	E2
Volume total récolté en mL	1,5	1,5	0,5	0,5	0,05	0,05
Volume déposé sur WB en µl	20	20	10	10	1	10

Colonne de fixation au nickel PROTINO (Macherey Nagel) avec complexe Ni-IDA

Les colonnes PROTINO sont équilibrées par 2 mL de tampon LEW fournit. Un volume de 2 mL contenant la protéine Gs est appliqué sur la colonne et traverse la colonne par gravité. Deux lavages par 2 mL de tampon LEW sont effectués, puis 3 éluions successives sont réalisées avec 1,5 mL de tampon ELU.

Les échantillons sont notés comme suit : SA : surnageant avant passage sur la colonne; SP : surnageant après passage sur la colonne; L1 : lavage N°1; L2 : lavage N°2; E1 : élution N°1; E2 : élution N°2 ; E3: élution N°3. Un volume de chaque échantillon a été déposé et analysé par WB. Les volumes des différentes fractions sont notés dans le tableau ci-joint. Chaque fraction a été conservée à -20°C.

Colonne / nom des échantillons	SA	SP	L1	L2	E1	E2	E3
Volume total récolté en mL	2	2	2	2	1,5	1,5	1,5
Volume déposé sur WB en µl	20	20	20	20	15	15	15

Banque d'hybridome

Ce travail a été réalisé par V.Guillaume et I.Grosjean (INSERM/U758 et Cellulonet/IBCP). Les souris ont été immunisées contre la protéine G par différentes techniques utilisant, un plasmide codant pour la protéine G, un virus de la Vaccine codant également pour la protéine G et des cellules Véro infectées par le virus Nipah sauvage. Après ces 3 immunisations successives, les cellules lymphoïdes de la rate ont été récoltées et fusionnées avec une lignée cellulaire myéloïde immortalisée (Sp2o/Ag14). Cette fusion a permis la formation de cellules nommées « hybridome » possédant la capacité de sécréter continuellement dans leur surnageant cellulaire, des IgG spécifiques de la protéine G. Ces anticorps monoclonaux ont ensuite été validés suivant leurs spécificités et répertoriés. Auparavant, les hybridomes étaient utilisés pour fabriquer des anticorps polyclonaux concentrés. L'hybridome était injecté par voie IP chez la souris en présence d'adjuvant de Freund. La souris développait une tumeur liquide nommée « ascite » (épanchement liquidien intra-péritonéale) qui était ponctionnée. De cette façon, des anticorps polyclonaux spécifiques de la protéine G du virus Nipah ont pu être obtenus. Ce procédé trop douloureux pour l'animal a été interdit pour des raisons éthiques. Dans ce travail de thèse, quelques ascites ont été utilisées mais la plupart des expériences ont été réalisées avec les surnageants d'hybridomes moins concentrés en IgG et tout aussi spécifiques.

Immunisation des animaux

Des souris mâles âgées de 6 semaines provenant de la société « Charles River » ont été hébergées en zone de sécurité A2 au sein de l'animalerie PBES UMS3444/US8, dans des cages à portoirs ventilés. Toutes les manipulations ont été réalisées sous hôte PSMII. Les injections par voie IM (tibialis antérieur) et par voie ID (oreille) ont été réalisées avec une aiguille à insuline de 0,3 mL. Les prélèvements sanguins ont été réalisés par voie rétro-orbitale avec une pipette pasteur non héparinée sous anesthésie à l'isofluorane.

Des hamsters dorés femelles âgés de 6 à 8 semaines provenant de la société « Janvier » ont été hébergés au sein de l'animalerie VALBEX (IUT Lyon) dans des cages à portoirs non ventilés. Les animaux ont été identifiés par une puce électronique insérée sous le pelage de l'animal. Pour les détails techniques, voir avec l'institut valbex.

ELISA

Le test ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) ou dosage immuno-enzymatique sur support solide, permet la détection d'IgG spécifiques de la protéine d'intérêt. Plusieurs outils ont été nécessaires pour développer ce test. Concernant la protéine Gs, les lots de surnageants contenant la protéine Gs ou le milieu contrôle sans protéine ont été aliquotés et conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation. En moyenne, un lot a été utilisé pour analyser une expérience animale. Pour la technique de l'ELISA, se référer au Matériel et Méthode de l'article A.Ploquin et al.

Extraction d'ARN de NiV des sérums de hamsters

L'ARN du virus Nipah contenu dans les particules circulantes contenues ou non dans les sérums des animaux infectés par 1000 pfu de NiV wt au laboratoire P4 ont été extraits suivant le protocole du kit « QiAmp viral RNA mini » (Qiagen).

Au sein du laboratoire P4, 100 µl de sérum ont été ajoutés à 400 µl de tampon AVL et incubés pendant 10 min à température ambiante. Ces échantillons ont ensuite pu être sortis du laboratoire P4. 500 µl d'EtOH 100 % a été ajouté et le mélange a été mixé pendant 15 s. Ce mélange a été transvasé sur une colonne d'extraction puis centrifugé à 10 000 rpm pendant 1 min. La colonne a été lavée par 500 µl de tampon AW1 puis centrifugée à 10 000 rpm pendant 1 min. 500 µl d'une deuxième solution de lavage AW2 a été déposée sur la colonne puis centrifugée à 14 000 rpm pendant 3 min. Une seconde centrifugation a été réalisée afin d'enlever toute trace d'éthanol contenu dans le tampon AW2, qui est un

inhibiteur de la transcriptase inverse. Enfin, 60 µl de tampon d'élution AVE ont été utilisés pour éluer les ARN du virus Nipah après une centrifugation pendant 1 min à 10 000 rpm. Les ARN ont été préalablement quantifiés par lecture de l'absorbance au nanodrop avant d'être stockés à -80°C.

qPCR

Pour les détails techniques, voir la partie Matériel et Méthode de l'article. Voici résumé dans ce tableau, les séquences des gènes utilisés pour les qPCR.

Nom	Détails	Séquence primer sense	Séquence primer anti-sense	Taille de l'amplicon
NiV N	Gène <i>N</i> de NiV (Mathieu <i>et al.</i> , 2011)	5'-GGCAGGATTCTTCGCAACCATC -3'	5'-GGCTCTTGGGCCAATTTCTCTG -3'	132 pb
NiV G	Gène <i>G</i> de NiV (Mathieu <i>et al.</i> , 2011)	5'-AGGTTCAAAGATCAGCCAGTCG -3'	5'-AAAGGGAGTGGGTTAGGACAAG -3'	122 pb
HeV N	Gène <i>N</i> de HeV	5'-GCCGGCTTCTTTGCGACTATC-3'	5'-CGCTCGAGGCCCTATTTCTCTG-3'	132 pb
HeV G	Gène <i>G</i> de HeV	5'-GGGATCCAAGATAAGTCAGTCT-3'	5'- AAAGGCAAAGGATTCGGACAAG-3'	123 pb
GFP	Gène <i>gfp</i>	5'- ATGGTGAGCAAGGGCGAGGA-3'	5'-CTCGCCGGACACGCTGAACT-3'	98 pb
CMV	Dans promoteur CMV	5'-ATGACCTTATGGGACTTTCCTACTTGG-3'	5'-CCCGTGAGTCAAACCGCTATCC-3'	117 pb
Gapdh	Gène de ménage pour les ADNc	5'-GCATGGCCTTCCGTGTTC-3'	5'-TGTCATCATACTTGGCAGGTTTCT-3'	84 pb
CD8a	Gène de ménage pour les ADNg	5'-GGTGCATTCTCACTCTGAGTTCC-3'	5'-GCAGACAGAGCTGTTTCCTATGTG-3'	107 pb

ADNc : ADN complémentaires obtenus par transcriptase inverse, ADNg : ADN génomique

Analyses statistiques

Tous les résultats sont exprimés en moyenne \pm l'écart standard à la moyenne ou SEM. Les analyses statistiques ont été réalisées par le logiciel GraphPad en réalisant des tests ANOVA-1, T de Student sur des échantillons appariés ou non. La valeur p est défini significative si $p < 0,05$ (*), très significative si $p < 0,01$ (**) ou extrêmement significative si $p < 0,001$ (**).

RÉFÉRENCES

- A -

- Adriouch, S., Franck, E., Drouot, L., Bonneau, C., Jolinon, N., Salvetti, A., and Boyer, O.** (2011). Improved Immunological Tolerance Following Combination Therapy with LTCA-4/Ig and AAV-Mediated PD-L1/2 Muscle Gene Transfer. *Front Microbiol* **2**, 199.
- Allocca, M., Mussolino, C., Garcia-Hoyos, M., Sanges, D., Iodice, C., Petrillo, M., Vandenberghe, L. H., Wilson, J. M., Marigo, V., Surace, E. M., and Auricchio, A.** (2007). Novel adeno-associated virus serotypes efficiently transduce murine photoreceptors. *J Virol* **81**(20), 11372-80.
- Aguiar Alpizar, Y., Karwacz, K., Arce, F., Yglesias Rivera, A., Fernandez, L. E., Collins, M. K., and Sanchez Ramirez, B.** (2012). Lentiviral vector followed by protein immunisation breaks tolerance against the self-antigen Her1 and results in lung cancer immunotherapy. *J Gene Med* **14**(3), 151-7.
- Arruda, V. R., Fields, P. A., Milner, R., Wainwright, L., De Miguel, M. P., Donovan, P. J., Herzog, R. W., Nichols, T. C., Biegel, J. A., Razavi, M., Dake, M., Huff, D., Flake, A. W., Couto, L., Kay, M. A., and High, K. A.** (2001). Lack of germline transmission of vector sequences following systemic administration of recombinant AAV-2 vector in males. *Mol Ther* **4**(6), 586-92.
- Arruda, V. R., and Xiao, W.** (2007). It's all about the clothing: capsid domination in the adeno-associated viral vector world. *J Thromb Haemost* **5**(1), 12-5.
- Asokan, A., Johnson, J. S., Li, C., and Samulski, R. J.** (2008). Bioluminescent virion shells: new tools for quantitation of AAV vector dynamics in cells and live animals. *Gene Ther* **15**(24), 1618-22.
- Atchison, R. W., Casto, B. C., and Hammon, W. M.** (1965). Adenovirus-Associated Defective Virus Particles. *Science* **149**(3685), 754-6.
- Ayuso, E., Mingozzi, F., and Bosch, F.** (2010). Production, purification and characterization of adeno-associated vectors. *Curr Gene Ther* **10**(6), 423-36.

- B -

- Balasuriya, U. B., Heidner, H. W., Davis, N. L., Wagner, H. M., Hullinger, P. J., Hedges, J. F., Williams, J. C., Johnston, R. E., David Wilson, W., Liu, I. K., and James MacLachlan, N.** (2002). Alphavirus replicon particles expressing the two major envelope proteins of equine arteritis virus induce high level protection against challenge with virulent virus in vaccinated horses. *Vaccine* **20**(11-12), 1609-17.
- Bartel, M., Schaffer, D., and Buning, H.** (2011). Enhancing the Clinical Potential of AAV Vectors by Capsid Engineering to Evade Pre-Existing Immunity. *Front Microbiol* **2**, 204.
- Bell, C. L., Gurda, B. L., Van Vliet, K., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J. M.** (2012). Identification of the galactose binding domain of the adeno-associated virus serotype 9 capsid. *J Virol* **86**(13), 7326-33.
- Benihoud, K., Yeh, P., and Perricaudet, M.** (1999). Adenovirus vectors for gene delivery. *Curr Opin Biotechnol* **10**(5), 440-7.
- Benlahrech, A., Harris, J., Meiser, A., Papagatsias, T., Hornig, J., Hayes, P., Lieber, A., Athanasopoulos, T., Bachy, V., Csomor, E., Daniels, R., Fisher, K., Gotch, F., Seymour, L., Logan, K., Barbagallo, R., Klavinskis, L., Dickson, G., and Patterson, S.** (2009). Adenovirus vector vaccination induces expansion of memory CD4 T cells with a mucosal homing phenotype that are readily susceptible to HIV-1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(47), 19940-5.
- Berns, K. I., and Parrish, C. R.** (2007). Parvoviridae. 5th ed. In "Fields virology", pp. 2437-2477. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Blacklow, N. R., Hoggan, M. D., and Rowe, W. P.** (1967). Isolation of adenovirus-associated viruses from man. *Proc Natl Acad Sci U S A* **58**(4), 1410-5.
- Bonaparte, M. I., Dimitrov, A. S., Bossart, K. N., Crameri, G., Mungall, B. A., Bishop, K. A., Choudhry, V., Dimitrov, D. S., Wang, L. F., Eaton, B. T., and Broder, C. C.** (2005). Ephrin-B2 ligand is a

- functional receptor for Hendra virus and Nipah virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**(30), 10652-7.
- Bossart, K. N., Bingham, J., and Middleton, D.** (2007). Targeted strategies for henipavirus therapeutics. *Open Virol J* **1**, 14-25.
- Bossart, K. N., Crameri, G., Dimitrov, A. S., Mungall, B. A., Feng, Y. R., Patch, J. R., Choudhary, A., Wang, L. F., Eaton, B. T., and Broder, C. C.** (2005a). Receptor binding, fusion inhibition, and induction of cross-reactive neutralizing antibodies by a soluble G glycoprotein of Hendra virus. *J Virol* **79**(11), 6690-702.
- Bossart, K. N., Geisbert, T. W., Feldmann, H., Zhu, Z., Feldmann, F., Geisbert, J. B., Yan, L., Feng, Y. R., Brining, D., Scott, D., Wang, Y., Dimitrov, A. S., Callison, J., Chan, Y. P., Hickey, A. C., Dimitrov, D. S., Broder, C. C., and Rockx, B.** (2011). A neutralizing human monoclonal antibody protects african green monkeys from hendra virus challenge. *Sci Transl Med* **3**(105), 105ra103.
- Bossart, K. N., McEachern, J. A., Hickey, A. C., Choudhry, V., Dimitrov, D. S., Eaton, B. T., and Wang, L. F.** (2007). Neutralization assays for differential henipavirus serology using Bio-Plex protein array systems. *J Virol Methods* **142**(1-2), 29-40.
- Bossart, K. N., Mungall, B. A., Crameri, G., Wang, L. F., Eaton, B. T., and Broder, C. C.** (2005b). Inhibition of Henipavirus fusion and infection by heptad-derived peptides of the Nipah virus fusion glycoprotein. *Virol J* **2**, 57.
- Bossart, K. N., Wang, L. F., Eaton, B. T., and Broder, C. C.** (2001). Functional expression and membrane fusion tropism of the envelope glycoproteins of Hendra virus. *Virology* **290**(1), 121-35.
- Bossart, K. N., Wang, L. F., Flora, M. N., Chua, K. B., Lam, S. K., Eaton, B. T., and Broder, C. C.** (2002). Membrane fusion tropism and heterotypic functional activities of the Nipah virus and Hendra virus envelope glycoproteins. *J Virol* **76**(22), 11186-98.
- Bossart, K. N., Zhu, Z., Middleton, D., Klippel, J., Crameri, G., Bingham, J., McEachern, J. A., Green, D., Hancock, T. J., Chan, Y. P., Hickey, A. C., Dimitrov, D. S., Wang, L. F., and Broder, C. C.** (2009). A neutralizing human monoclonal antibody protects against lethal disease in a new ferret model of acute nipah virus infection. *PLoS Pathog* **5**(10), e1000642.
- Boutin, S., Monteilhet, V., Veron, P., Leborgne, C., Benveniste, O., Montus, M. F., and Masurier, C.** (2010). Prevalence of serum IgG and neutralizing factors against adeno-associated virus (AAV) types 1, 2, 5, 6, 8, and 9 in the healthy population: implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* **21**(6), 704-12.
- Bowden, T. A., Aricescu, A. R., Gilbert, R. J., Grimes, J. M., Jones, E. Y., and Stuart, D. I.** (2008a). Structural basis of Nipah and Hendra virus attachment to their cell-surface receptor ephrin-B2. *Nat Struct Mol Biol* **15**(6), 567-72.
- Bowden, T. A., Crispin, M., Harvey, D. J., Aricescu, A. R., Grimes, J. M., Jones, E. Y., and Stuart, D. I.** (2008b). Crystal structure and carbohydrate analysis of Nipah virus attachment glycoprotein: a template for antiviral and vaccine design. *J Virol* **82**(23), 11628-36.
- Breous, E., Somanathan, S., Bell, P., and Wilson, J. M.** (2011). Inflammation promotes the loss of adeno-associated virus-mediated transgene expression in mouse liver. *Gastroenterology* **141**(1), 348-57, 357 e1-3.
- Brockstedt, D. G., Podsakoff, G. M., Fong, L., Kurtzman, G., Mueller-Ruchholtz, W., and Engleman, E. G.** (1999). Induction of immunity to antigens expressed by recombinant adeno-associated virus depends on the route of administration. *Clin Immunol* **92**(1), 67-75.
- Broder, C. C.** (2012a). Henipavirus outbreaks to antivirals: the current status of potential therapeutics. *Curr Opin Virol* **2**(2), 176-87.
- Broder, C. C., Geisbert, T. W., Xu, K., Nikolov, D. B., Wang, L. F., Middleton, D., Pallister, J., and Bossart, K. N.** (2012b). Immunization Strategies Against Henipaviruses. *Curr Top Microbiol Immunol*.
- Brown, K. E.** (2010). The expanding range of parvoviruses which infect humans. *Rev Med Virol* **20**(4), 231-44.

- Buchbinder, S. P., Mehrotra, D. V., Duerr, A., Fitzgerald, D. W., Mogg, R., Li, D., Gilbert, P. B., Lama, J. R., Marmor, M., Del Rio, C., McElrath, M. J., Casimiro, D. R., Gottesdiener, K. M., Chodakewitz, J. A., Corey, L., and Robertson, M. N.** (2008). Efficacy assessment of a cell-mediated immunity HIV-1 vaccine (the Step Study): a double-blind, randomised, placebo-controlled, test-of-concept trial. *Lancet* **372**(9653), 1881-93.
- Buchschacher, G. L., Jr., and Wong-Staal, F.** (2000). Development of lentiviral vectors for gene therapy for human diseases. *Blood* **95**(8), 2499-504.
- Buller, R. M., Janik, J. E., Sebring, E. D., and Rose, J. A.** (1981). Herpes simplex virus types 1 and 2 completely help adenovirus-associated virus replication. *J Virol* **40**(1), 241-7.
- Buning, H., Bolyard, C. M., Hallek, M., and Bartlett, J. S.** (2011). Modification and labeling of AAV vector particles. *Methods Mol Biol* **807**, 273-300.
- Buning, H., Perabo, L., Coutelle, O., Quadt-Humme, S., and Hallek, M.** (2008). Recent developments in adeno-associated virus vector technology. *J Gene Med* **10**(7), 717-33.

- C -

- Calcedo, R., Morizono, H., Wang, L., McCarter, R., He, J., Jones, D., Batshaw, M. L., and Wilson, J. M.** (2011). Adeno-associated virus antibody profiles in newborns, children, and adolescents. *Clin Vaccine Immunol* **18**(9), 1586-8.
- Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Gao, G., Lin, J., and Wilson, J. M.** (2009). Worldwide epidemiology of neutralizing antibodies to adeno-associated viruses. *J Infect Dis* **199**(3), 381-90.
- Campbell, N. A., and Reece, J. B.** (2004). "Biologie." De Boeck Université ed. Trans. R. Mathieu, Bruxelles.
- Cao, O., Dobrzynski, E., Wang, L., Nayak, S., Mingle, B., Terhorst, C., and Herzog, R. W.** (2007). Induction and role of regulatory CD4+CD25+ T cells in tolerance to the transgene product following hepatic in vivo gene transfer. *Blood* **110**(4), 1132-40.
- Cardosa, M. J., Hooi, T. P., and Kaur, P.** (1995). Japanese encephalitis virus is an important cause of encephalitis among children in Penang. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **26**(2), 272-5.
- Carter, B. J.** (2005). Adeno-associated virus vectors in clinical trials. *Hum Gene Ther* **16**(5), 541-50.
- Cearley, C. N., Vandenberghe, L. H., Parente, M. K., Carnish, E. R., Wilson, J. M., and Wolfe, J. H.** (2008). Expanded repertoire of AAV vector serotypes mediate unique patterns of transduction in mouse brain. *Mol Ther* **16**(10), 1710-8.
- Centers for Disease Control and Prevention, C.** (1999a). Outbreak of Hendra-like virus—Malaysia and Singapore, 1998-1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **vol 48**(3), 265-269.
- Centers for Disease Control and Prevention, C.** (1999b). Update: Outbreak of Nipah virus-- Malaysia and Singapore, 1999. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **vol 48**(no 16), 335-337.
- Chan, Y. P., Chua, K. B., Koh, C. L., Lim, M. E., and Lam, S. K.** (2001). Complete nucleotide sequences of Nipah virus isolates from Malaysia. *J Gen Virol* **82**(Pt 9), 2151-5.
- Chattopadhyay, A., and Rose, J. K.** (2011). Complementing defective viruses that express separate paramyxovirus glycoproteins provide a new vaccine vector approach. *J Virol* **85**(5), 2004-11.
- Chirmule, N., Probert, K., Magosin, S., Qian, Y., Qian, R., and Wilson, J.** (1999). Immune responses to adenovirus and adeno-associated virus in humans. *Gene Ther* **6**(9), 1574-83.
- Chirmule, N., Xiao, W., Truneh, A., Schnell, M. A., Hughes, J. V., Zoltick, P., and Wilson, J. M.** (2000). Humoral immunity to adeno-associated virus type 2 vectors following administration to murine and nonhuman primate muscle. *J Virol* **74**(5), 2420-5.
- Chong, H.T., Kunjapan, S.R., Thayaparan, T., Tong, J.M.G., Petharunam, V., Jusoh, R.M., and Tan, C.T.** (2000). Nipah encephalitis outbreak in Malaysia, clinical features in patients from Seremban. *Neurol J Southeast Asia* **5**, 61-67.
- Chong, H.T., Tan, C.T., Karim, N., Wong, K.T., Kumar, S., Abdullah, W., Chua, K.B., Lam, S.K., Goh, K.J., Chew, N.K., Petharunam, V., Kunjapan, S.R., and Thayaparan, T.** (2001a). Outbreak of Nipah encephalitis among pig-farm workers in Malaysia in 1998/1999: Was there any role for Japanese encephalitis? *Neurol J Southeast Asia* **6**, 129-134.

- Chong, H. T., Kamarulzaman, A., Tan, C. T., Goh, K. J., Thayaparan, T., Kunjapan, S. R., Chew, N. K., Chua, K. B., and Lam, S. K.** (2001b). Treatment of acute Nipah encephalitis with ribavirin. *Ann Neurol* **49**(6), 810-3.
- Chow, V. T., Tambyah, P. A., Yeo, W. M., Phoon, M. C., and Howe, J.** (2000). Diagnosis of nipah virus encephalitis by electron microscopy of cerebrospinal fluid. *J Clin Virol* **19**(3), 143-7.
- Chua, K. B.** (2003). Nipah virus outbreak in Malaysia. *J Clin Virol* **26**(3), 265-75.
- Chua, K. B., Bellini, W. J., Rota, P. A., Harcourt, B. H., Tamin, A., Lam, S. K., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Zaki, S. R., Shieh, W., Goldsmith, C. S., Gubler, D. J., Roehrig, J. T., Eaton, B., Gould, A. R., Olson, J., Field, H., Daniels, P., Ling, A. E., Peters, C. J., Anderson, L. J., and Mahy, B. W.** (2000a). Nipah virus: a recently emergent deadly paramyxovirus. *Science* **288**(5470), 1432-5.
- Chua, K. B., Goh, K. J., Wong, K. T., Kamarulzaman, A., Tan, P. S., Ksiazek, T. G., Zaki, S. R., Paul, G., Lam, S. K., and Tan, C. T.** (1999). Fatal encephalitis due to Nipah virus among pig-farmers in Malaysia. *Lancet* **354**(9186), 1257-9.
- Chua, K. B., Koh, C. L., Hooi, P. S., Wee, K. F., Khong, J. H., Chua, B. H., Chan, Y. P., Lim, M. E., and Lam, S. K.** (2002). Isolation of Nipah virus from Malaysian Island flying-foxes. *Microbes Infect* **4**(2), 145-51.
- Chua, K. B., Lam, S. K., Goh, K. J., Hooi, P. S., Ksiazek, T. G., Kamarulzaman, A., Olson, J., and Tan, C. T.** (2001). The presence of Nipah virus in respiratory secretions and urine of patients during an outbreak of Nipah virus encephalitis in Malaysia. *J Infect* **42**(1), 40-3.
- Chua, K. B., Lam, S. K., Tan, C. T., Hooi, P. S., Goh, K. J., Chew, N. K., Tan, K. S., Kamarulzaman, A., and Wong, K. T.** (2000b). High mortality in Nipah encephalitis is associated with presence of virus in cerebrospinal fluid. *Ann Neurol* **48**(5), 802-5.
- Coffin, J. M., Hughes, S. H., and Varmus, H. E.** (1997). Retroviruses. *Cold Spring Harbor Laboratory Press*.

- D -

- Dai, Y., Schwarz, E. M., Gu, D., Zhang, W. W., Sarvetnick, N., and Verma, I. M.** (1995). Cellular and humoral immune responses to adenoviral vectors containing factor IX gene: tolerization of factor IX and vector antigens allows for long-term expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(5), 1401-5.
- Davis, N. L., Caley, I. J., Brown, K. W., Betts, M. R., Irlbeck, D. M., McGrath, K. M., Connell, M. J., Montefiori, D. C., Frelinger, J. A., Swanstrom, R., Johnson, P. R., and Johnston, R. E.** (2000). Vaccination of macaques against pathogenic simian immunodeficiency virus with Venezuelan equine encephalitis virus replicon particles. *J Virol* **74**(1), 371-8.
- Daya, S., and Berns, K. I.** (2008). Gene therapy using adeno-associated virus vectors. *Clin Microbiol Rev* **21**(4), 583-93.
- Defang, G. N., Khetawat, D., Broder, C. C., and Quinnan, G. V., Jr.** (2010). Induction of neutralizing antibodies to Hendra and Nipah glycoproteins using a Venezuelan equine encephalitis virus in vivo expression system. *Vaccine* **29**(2), 212-20.
- Defang, G. N., Khetawat, D., Broder, C. C., and Quinnan, G. V., Jr.** (2011). Induction of neutralizing antibodies to Hendra and Nipah glycoproteins using a Venezuelan equine encephalitis virus in vivo expression system. *Vaccine* **29**(2), 212-20.
- Dekker, C. L., Gordon, L., and Klein, J.** (2008). Dose Optimization Strategies for Vaccines: The Role of Adjuvants and New Technologies. *National Vaccine Advisory Committee (NVAC) report*.
- Di Nunzio, F., Felix, T., Arhel, N. J., Nisole, S., Charneau, P., and Beignon, A. S.** (2012). HIV-derived vectors for therapy and vaccination against HIV. *Vaccine* **30**(15), 2499-509.
- Di Pasquale, G., Davidson, B. L., Stein, C. S., Martins, I., Scudiero, D., Monks, A., and Chiorini, J. A.** (2003). Identification of PDGFR as a receptor for AAV-5 transduction. *Nat Med* **9**(10), 1306-12.
- Diederich, S., and Maisner, A.** (2007). Molecular characteristics of the Nipah virus glycoproteins. *Ann N Y Acad Sci* **1102**, 39-50.

- Dodd, K. A., Bird, B. H., Metcalfe, M. G., Nichol, S. T., and Albarino, C. G.** (2012). Single-dose immunization with virus replicon particles confers rapid robust protection against Rift Valley fever virus challenge. *J Virol* **86**(8), 4204-12.
- Donsante, A., Miller, D. G., Li, Y., Vogler, C., Brunt, E. M., Russell, D. W., and Sands, M. S.** (2007). AAV vector integration sites in mouse hepatocellular carcinoma. *Science* **317**(5837), 477.
- Donsante, A., Vogler, C., Muzyczka, N., Crawford, J. M., Barker, J., Flotte, T., Campbell-Thompson, M., Daly, T., and Sands, M. S.** (2001). Observed incidence of tumorigenesis in long-term rodent studies of rAAV vectors. *Gene Ther* **8**(17), 1343-6.
- Drew, D. R., Lightowlers, M., and Strugnell, R. A.** (2000). Humoral immune responses to DNA vaccines expressing secreted, membrane bound and non-secreted forms of the Tania ovis 45W antigen. *Vaccine* **18**(23), 2522-32.
- Drexler, J. F., Corman, V. M., Muller, M. A., Maganga, G. D., Vallo, P., Binger, T., Gloza-Rausch, F., Rasche, A., Yordanov, S., Seebens, A., Oppong, S., Sarkodie, Y. A., Pongombo, C., Lukashev, A. N., Schmidt-Chanasit, J., Stocker, A., Carneiro, A. J., Erbar, S., Maisner, A., Fronhoffs, F., Buettner, R., Kalko, E. K., Kruppa, T., Franke, C. R., Kallies, R., Yandoko, E. R., Herrler, G., Reusken, C., Hassanin, A., Kruger, D. H., Matthee, S., Ulrich, R. G., Leroy, E. M., and Drosten, C.** (2012). Bats host major mammalian paramyxoviruses. *Nat Commun* **3**, 796.
- Du, L., He, Y., Wang, Y., Zhang, H., Ma, S., Wong, C. K., Wu, S. H., Ng, F., Huang, J. D., Yuen, K. Y., Jiang, S., Zhou, Y., and Zheng, B. J.** (2006). Recombinant adeno-associated virus expressing the receptor-binding domain of severe acute respiratory syndrome coronavirus S protein elicits neutralizing antibodies: Implication for developing SARS vaccines. *Virology* **353**(1), 6-16.
- Du, L., Zhao, G., Lin, Y., Chan, C., He, Y., Jiang, S., Wu, C., Jin, D. Y., Yuen, K. Y., Zhou, Y., and Zheng, B. J.** (2008). Priming with rAAV encoding RBD of SARS-CoV S protein and boosting with RBD-specific peptides for T cell epitopes elevated humoral and cellular immune responses against SARS-CoV infection. *Vaccine* **26**(13), 1644-51.
- Duan, D., Yue, Y., and Engelhardt, J. F.** (2001). Expanding AAV packaging capacity with trans-splicing or overlapping vectors: a quantitative comparison. *Mol Ther* **4**(4), 383-91.
- Dudek, T., and Knipe, D. M.** (2006). Replication-defective viruses as vaccines and vaccine vectors. *Virology* **344**(1), 230-9.

- E -

- Eaton, B. T., Broder, C. C., Middleton, D., and Wang, L. F.** (2006a). Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nat Rev Microbiol* **4**(1), 23-35.
- Eaton, B. T., Broder, C. C., Middleton, D., and Wang, L. F.** (2006b). Hendra and Nipah viruses: different and dangerous. *Nature Rev. Microbiol.* **4**, 23-35.
- Eaton, B. T., Broder, C. C., and Wang, L. F.** (2005). Hendra and Nipah viruses: pathogenesis and therapeutics. *Curr Mol Med* **5**(8), 805-16.
- Eaton, B. T., Mackenzie, J. S., and Wang, L. F.** (2007). Henipavirus. 5th ed. In "Fields virology", Vol. II, pp. 1587-1600. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- El Garch, H., Richard, S., Piras, F., Leard, T., Poulet, H., Andreoni, C., and Juillard, V.** (2006). Feline Leukemia Virus (FeLV)- Specific IFN γ T-Cell Responses Are Induced in Cats Following Transdermal Vaccination With a Recombinant FeLV Vaccine. *Intern J Appl Res Vet Med* **4**(2).
- Eshaghi, M., Tan, W. S., Mohidin, T. B., and Yusoff, K.** (2004). Nipah virus glycoprotein: production in baculovirus and application in diagnosis. *Virus Res* **106**(1), 71-6.

- F -

- Fallaux, F. J., Bout, A., van der Velde, I., van den Wollenberg, D. J., Hehir, K. M., Keegan, J., Auger, C., Cramer, S. J., van Ormondt, H., van der Eb, A. J., Valerio, D., and Hoebe, R. C.** (1998). New helper cells and matched early region 1-deleted adenovirus vectors prevent generation of replication-competent adenoviruses. *Hum Gene Ther* **9**(13), 1909-17.

- Fang, Z. Y., Limbach, K., Tartaglia, J., Hammonds, J., Chen, X., and Spearman, P.** (2001). Expression of vaccinia E3L and K3L genes by a novel recombinant canarypox HIV vaccine vector enhances HIV-1 pseudovirion production and inhibits apoptosis in human cells. *Virology* **291**(2), 272-84.
- Favaro, P., Downey, H. D., Zhou, J. S., Wright, J. F., Hauck, B., Mingozzi, F., High, K. A., and Arruda, V. R.** (2009). Host and vector-dependent effects on the risk of germline transmission of AAV vectors. *Mol Ther* **17**(6), 1022-30.
- Fenner, F.** (1989). Risks and benefits of vaccinia vaccine use in the worldwide smallpox eradication campaign. *Res Virol* **140**(5), 465-6; discussion 487-91.
- Ferrari, F. K., Samulski, T., Shenk, T., and Samulski, R. J.** (1996). Second-strand synthesis is a rate-limiting step for efficient transduction by recombinant adeno-associated virus vectors. *J Virol* **70**(5), 3227-34.
- Fisher, K. J., Gao, G. P., Weitzman, M. D., DeMatteo, R., Burda, J. F., and Wilson, J. M.** (1996). Transduction with recombinant adeno-associated virus for gene therapy is limited by leading-strand synthesis. *J Virol* **70**(1), 520-32.
- Flotte, T. R., and Berns, K. I.** (2005). Adeno-associated virus: a ubiquitous commensal of mammals. *Hum Gene Ther* **16**(4), 401-7.
- Foo, S. S., Turner, C. J., Adams, S., Compagni, A., Aubyn, D., Kogata, N., Lindblom, P., Shani, M., Zicha, D., and Adams, R. H.** (2006). Ephrin-B2 controls cell motility and adhesion during blood-vessel-wall assembly. *Cell* **124**(1), 161-73.
- Frecha, C., Costa, C., Negre, D., Gauthier, E., Russell, S. J., Cosset, F. L., and Verhoeven, E.** (2008). Stable transduction of quiescent T cells without induction of cycle progression by a novel lentiviral vector pseudotyped with measles virus glycoproteins. *Blood* **112**(13), 4843-52.
- Freiberg, A. N., Worthy, M. N., Lee, B., and Holbrook, M. R.** (2010). Combined chloroquine and ribavirin treatment does not prevent death in a hamster model of Nipah and Hendra virus infection. *J Gen Virol* **91**(Pt 3), 765-72.
- Fu, H., Muenzer, J., Samulski, R. J., Breese, G., Sifford, J., Zeng, X., and McCarty, D. M.** (2003). Self-complementary adeno-associated virus serotype 2 vector: global distribution and broad dispersion of AAV-mediated transgene expression in mouse brain. *Mol Ther* **8**(6), 911-7.

- G -

- Gambotto, A., Dworacki, G., Cicinnati, V., Kenniston, T., Steitz, J., Tuting, T., Robbins, P. D., and DeLeo, A. B.** (2000). Immunogenicity of enhanced green fluorescent protein (EGFP) in BALB/c mice: identification of an H2-Kd-restricted CTL epitope. *Gene Ther* **7**(23), 2036-40.
- Gao, G., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J. M.** (2002a). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 11854-11859.
- Gao, G., Lu, Y., Calcedo, R., Grant, R. L., Bell, P., Wang, L., Figueredo, J., Lock, M., and Wilson, J. M.** (2006). Biology of AAV serotype vectors in liver-directed gene transfer to nonhuman primates. *Mol Ther* **13**(1), 77-87.
- Gao, G., Vandenberghe, L. H., Alvira, M. R., Lu, Y., Calcedo, R., Zhou, X., and Wilson, J. M.** (2004). Clades of Adeno-associated viruses are widely disseminated in human tissues. *J Virol* **78**(12), 6381-8.
- Gao, G., Wang, Q., Calcedo, R., Mays, L., Bell, P., Wang, L., Vandenberghe, L. H., Grant, R. L., Sanmiguel, J., Furth, E. E., and Wilson, J. M.** (2009). AAV-mediated gene transfer to nonhuman primate liver can elicit destructive transgene-specific T cell responses. *Hum Gene Ther*.
- Gao, G. P., Alvira, M. R., Wang, L., Calcedo, R., Johnston, J., and Wilson, J. M.** (2002b). Novel adeno-associated viruses from rhesus monkeys as vectors for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(18), 11854-9.
- Gao, G. P., Yang, Y., and Wilson, J. M.** (1996). Biology of adenovirus vectors with E1 and E4 deletions for liver-directed gene therapy. *J Virol* **70**(12), 8934-43.

- Gaudet, D., de Wal, J., Tremblay, K., Dery, S., van Deventer, S., Freidig, A., Brisson, D., and Methot, J. (2010). Review of the clinical development of alipogene tiparvovec gene therapy for lipoprotein lipase deficiency. *Atheroscler Suppl* **11**(1), 55-60.
- Geisbert, T. W., Daddario-DiCaprio, K. M., Hickey, A. C., Smith, M. A., Chan, Y. P., Wang, L. F., Mattapallil, J. J., Geisbert, J. B., Bossart, K. N., and Broder, C. C. (2010). Development of an acute and highly pathogenic nonhuman primate model of Nipah virus infection. *PLoS One* **5**(5), e10690.
- Geisbert, T. W., and Feldmann, H. (2011). Recombinant vesicular stomatitis virus-based vaccines against Ebola and Marburg virus infections. *J Infect Dis* **204** Suppl 3, S1075-81.
- Genesca, M. (2011). Characterization of an effective LTC response against HIV and SIV infections. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 103924.
- Geoffroy, M. C., and Salvetti, A. (2005). Helper functions required for wild type and recombinant adeno-associated virus growth. *Curr Gene Ther* **5**(3), 265-71.
- Georges-Courbot, M. C., Contamin, H., Faure, C., Loth, P., Baize, S., Leyssen, P., Neyts, J., and Deubel, V. (2006). Poly(I)-poly(C12U) but not ribavirin prevents death in a hamster model of Nipah virus infection. *Antimicrob Agents Chemother* **50**(5), 1768-72.
- Gherardi, M. M., and Esteban, M. (1999). Mucosal and systemic immune responses induced after oral delivery of vaccinia virus recombinants. *Vaccine* **17**(9-10), 1074-83.
- Ghosh, A., Yue, Y., and Duan, D. (2006). Viral serotype and the transgene sequence influence overlapping adeno-associated viral (AAV) vector-mediated gene transfer in skeletal muscle. *J Gene Med* **8**(3), 298-305.
- Ghosh, A., Yue, Y., Lai, Y., and Duan, D. (2008). A hybrid vector system expands adeno-associated viral vector packaging capacity in a transgene-independent manner. *Mol Ther* **16**(1), 124-30.
- Ghosh, A., Yue, Y., Shin, J. H., and Duan, D. (2009). Systemic Trans-splicing adeno-associated viral delivery efficiently transduces the heart of adult mdx mouse, a model for duchenne muscular dystrophy. *Hum Gene Ther* **20**(11), 1319-28.
- Goh, K. J., Tan, C. T., Chew, N. K., Tan, P. S., Kamarulzaman, A., Sarji, S. A., Wong, K. T., Abdullah, B. J., Chua, K. B., and Lam, S. K. (2000). Clinical features of Nipah virus encephalitis among pig farmers in Malaysia. *N Engl J Med* **342**(17), 1229-35.
- Gomez, C. E., Najera, J. L., Krupa, M., and Esteban, M. (2008). The poxvirus vectors MVA and NYVAC as gene delivery systems for vaccination against infectious diseases and cancer. *Curr Gene Ther* **8**(2), 97-120.
- Gomez, C. E., Perdiguero, B., Jimenez, V., Filali-Mouhim, A., Ghneim, K., Haddad, E. K., Quakkerlaar, E. D., Delaloye, J., Harari, A., Roger, T., Dunhen, T., Sekaly, R. P., Melief, C. J., Calandra, T., Sallusto, F., Lanzavecchia, A., Wagner, R., Pantaleo, G., and Esteban, M. (2012). Systems Analysis of MVA-C Induced Immune Response Reveals Its Significance as a Vaccine Candidate against HIV/AIDS of Clade C. *PLoS One* **7**(4), e35485.
- Grimm, D., and Kay, M. A. (2003a). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr. Gene Ther.* **3**(4), 281-304.
- Grimm, D., and Kay, M. A. (2003b). From virus evolution to vector revolution: use of naturally occurring serotypes of adeno-associated virus (AAV) as novel vectors for human gene therapy. *Curr Gene Ther* **3**(4), 281-304.
- Grimm, D., Kay, M. A., and Kleinschmidt, J. A. (2003). Helper virus-free, optically controllable, and two-plasmid-based production of adeno-associated virus vectors of serotypes 1 to 6. *Mol. Ther.* **7**, 839-850.
- Guillaume, V., Aslan, H., Ainouze, M., Guerbois, M., Wild, T. F., Buckland, R., and Langedijk, J. P. (2006a). Evidence of a potential receptor-binding site on the Nipah virus G protein (NiV-G): identification of globular head residues with a role in fusion promotion and their localization on an NiV-G structural model. *J Virol* **80**(15), 7546-54.

- Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Georges-Courbot, M. C., Lefevre, A., Marianneau, P., Chua, K. B., Lam, S. K., Buckland, R., Deubel, V., and Wild, T. F. (2004a).** Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J. Virol.* **78**(2), 834-840.
- Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Georges-Courbot, M. C., Lefevre, A., Marianneau, P., Chua, K. B., Lam, S. K., Buckland, R., Deubel, V., and Wild, T. F. (2004b).** Nipah virus: vaccination and passive protection studies in a hamster model. *J Virol* **78**(2), 834-40.
- Guillaume, V., Contamin, H., Loth, P., Grosjean, I., Courbot, M. C., Deubel, V., Buckland, R., and Wild, T. F. (2006b).** Antibody prophylaxis and therapy against Nipah virus infection in hamsters. *J Virol* **80**(4), 1972-8.
- Guillaume, V., Wong, K. T., Looi, R. Y., Georges-Courbot, M. C., Barrot, L., Buckland, R., Wild, T. F., and Horvat, B. (2009).** Acute Hendra virus infection: Analysis of the pathogenesis and passive antibody protection in the hamster model. *Virology* **387**(2), 459-65.
- Gurley, E. S., Montgomery, J. M., Hossain, M. J., Bell, M., Azad, A. K., Islam, M. R., Molla, M. A., Carroll, D. S., Ksiazek, T. G., Rota, P. A., Lowe, L., Comer, J. A., Rollin, P., Czub, M., Grolla, A., Feldmann, H., Luby, S. P., Woodward, J. L., and Breiman, R. F. (2007).** Person-to-person transmission of Nipah virus in a Bangladeshi community. *Emerg Infect Dis* **13**(7), 1031-7.

- H -

- Halbert, C. L., Miller, A. D., McNamara, S., Emerson, J., Gibson, R. L., Ramsey, B., and Aitken, M. L. (2006).** Prevalence of neutralizing antibodies against adeno-associated virus (AAV) types 2, 5, and 6 in cystic fibrosis and normal populations: Implications for gene therapy using AAV vectors. *Hum Gene Ther* **17**(4), 440-7.
- Halpin, K., Hyatt, A. D., Fogarty, R., Middleton, D., Bingham, J., Epstein, J. H., Rahman, S. A., Hughes, T., Smith, C., Field, H. E., and Daszak, P. (2011).** Pteropid bats are confirmed as the reservoir hosts of henipaviruses: a comprehensive experimental study of virus transmission. *Am J Trop Med Hyg* **85**(5), 946-51.
- Halpin, K., Young, P. L., Field, H. E., and Mackenzie, J. S. (2000).** Isolation of Hendra virus from pteropid bats: a natural reservoir of Hendra virus. *J Gen Virol* **81**(Pt 8), 1927-32.
- Hansen, J., Qing, K., and Srivastava, A. (2001).** Infection of purified nuclei by adeno-associated virus 2. *Mol Ther* **4**(4), 289-96.
- Harcourt, B. H., Lowe, L., Tamin, A., Liu, X., Bankamp, B., Bowden, N., Rollin, P. E., Comer, J. A., Ksiazek, T. G., Hossain, M. J., Gurley, E. S., Breiman, R. F., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2005).** Genetic characterization of Nipah virus, Bangladesh, 2004. *Emerg Infect Dis* **11**(10), 1594-7.
- Harcourt, B. H., Tamin, A., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Anderson, L. J., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2000).** Molecular characterization of Nipah virus, a newly emergent paramyxovirus. *Virology* **271**(2), 334-49.
- Harit, A. K., Ichhpujani, R. L., Gupta, S., Gill, K. S., Lal, S., Ganguly, N. K., and Agarwal, S. P. (2006).** Nipah/Hendra virus outbreak in Siliguri, West Bengal, India in 2001. *Indian J Med Res* **123**(4), 553-60.
- Hauck, B., Zhao, W., High, K., and Xiao, W. (2004).** Intracellular viral processing, not single-stranded DNA accumulation, is crucial for recombinant adeno-associated virus transduction. *J Virol* **78**(24), 13678-86.
- He, Y., Munn, D., and Faló, L. D., Jr. (2007).** Recombinant lentivector as a genetic immunization vehicle for antitumor immunity. *Expert Rev Vaccines* **6**(6), 913-24.
- Henckaerts, E., and Linden, R. M. (2010).** Adeno-associated virus: a key to the human genome? *Future Virol* **5**(5), 555-574.
- Herzog, R. W., Hagstrom, J. N., Kung, S. H., Tai, S. J., Wilson, J. M., Fisher, K. J., and High, K. A. (1997).** Stable gene transfer and expression of human blood coagulation factor IX after intramuscular injection of recombinant adeno-associated virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**(11), 5804-9.

- Hess, I. M., Massey, P. D., Walker, B., Middleton, D. J., and Wright, T. M. (2011). Hendra virus: what do we know? *N S W Public Health Bull* **22**(5-6), 118-22.
- Hevey, M., Negley, D., Pushko, P., Smith, J., and Schmaljohn, A. (1998). Marburg virus vaccines based upon alphavirus replicons protect guinea pigs and nonhuman primates. *Virology* **251**(1), 28-37.
- High, K. A., and Aubourg, P. (2011). rAAV human trial experience. *Methods Mol Biol* **807**, 429-57.
- Horvat, B., Guillaume, V., Wild, T. (2007). Les virus Nipah et Hendra : des agents pathogènes zoonotiques émergents. *Virologie* **10**(N°5), 1-10.
- Hosel, M., Broxtermann, M., Janicki, H., Esser, K., Arzberger, S., Hartmann, P., Gillen, S., Kleeff, J., Stabenow, D., Odenthal, M., Knolle, P., Hallek, M., Protzer, U., and Buning, H. (2012). Toll-like receptor 2-mediated innate immune response in human nonparenchymal liver cells toward adeno-associated viral vectors. *Hepatology* **55**(1), 287-97.
- Hossain, M. J., Gurley, E. S., Montgomery, J. M., Bell, M., Carroll, D. S., Hsu, V. P., Formenty, P., Croisier, A., Bertherat, E., Faiz, M. A., Azad, A. K., Islam, R., Molla, M. A., Ksiazek, T. G., Rota, P. A., Comer, J. A., Rollin, P. E., Luby, S. P., and Breiman, R. F. (2008). Clinical presentation of nipah virus infection in Bangladesh. *Clin Infect Dis* **46**(7), 977-84.
- Hsu, V. P., Hossain, M. J., Parashar, U. D., Ali, M. M., Ksiazek, T. G., Kuzmin, I., Niezgod, M., Rupprecht, C., Bresee, J., and Breiman, R. F. (2004). Nipah virus encephalitis reemergence, Bangladesh. *Emerg Infect Dis* **10**(12), 2082-7.
- Hurlbut, G. D., Ziegler, R. J., Nietupski, J. B., Foley, J. W., Woodworth, L. A., Meyers, E., Bercury, S. D., Pande, N. N., Souza, D. W., Bree, M. P., Lukason, M. J., Marshall, J., Cheng, S. H., and Scheule, R. K. (2010). Preexisting immunity and low expression in primates highlight translational challenges for liver-directed AAV8-mediated gene therapy. *Mol Ther* **18**(11), 1983-94.
- Huser, D., Gogol-Doring, A., Lutter, T., Weger, S., Winter, K., Hammer, E. M., Cathomen, T., Reinert, K., and Heilbronn, R. (2010). Integration preferences of wildtype AAV-2 for consensus re-binding sites at numerous loci in the human genome. *PLoS Pathog* **6**(7), e1000985.
- Hyatt, A. D., Zaki, S. R., Goldsmith, C. S., Wise, T. G., and Hengstberger, S. G. (2001). Ultrastructure of Hendra virus and Nipah virus within cultured cells and host animals. *Microbes Infect* **3**(4), 297-306.

- I -

- ICDDR,B, C. f. H. a. P. R. (2004). Person-to-person transmission of Nipah virus during outbreak in Faridpur District, 2004. *Health and Science Bulletin, HSB* **2**(2), 5-9.
- Ichinohe, T., Kawaguchi, A., Tamura, S., Takahashi, H., Sawa, H., Ninomiya, A., Imai, M., Itamura, S., Odagiri, T., Tashiro, M., Chiba, J., Sata, T., Kurata, T., and Hasegawa, H. (2007). Intranasal immunization with H5N1 vaccine plus Poly I:Poly C12U, a Toll-like receptor agonist, protects mice against homologous and heterologous virus challenge. *Microbes Infect* **9**(11), 1333-40.
- Imler, J. L. (1995). Adenovirus vectors as recombinant viral vaccines. *Vaccine* **13**(13), 1143-51.

- J -

- Johnson, J. B., Aguilar, H. C., Lee, B., and Parks, G. D. (2011). Interactions of human complement with virus particles containing the nipah virus glycoproteins. *J Virol* **85**(12), 5940-8.
- Johnson, P. R., Schnepf, B. C., Connell, M. J., Rohne, D., Robinson, S., Krivulka, G. R., Lord, C. I., Zinn, R., Montefiori, D. C., Letvin, N. L., and Clark, K. R. (2005a). Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J Virol* **79**(2), 955-65.
- Johnson, P. R., Schnepf, B. C., Connell, M. J., Rohne, D., Robinson, S., Krivulka, G. R., Lord, C. I., Zinn, R., Montefiori, D. C., Letvin, N. L., and Clark, K. R. (2005b). Novel adeno-associated virus vector vaccine restricts replication of simian immunodeficiency virus in macaques. *J Virol* **79**(2), 955-965.

- Johnston, R. E., Johnson, P. R., Connell, M. J., Montefiori, D. C., West, A., Collier, M. L., Cecil, C., Swanstrom, R., Frelinger, J. A., and Davis, N. L.** (2005). Vaccination of macaques with SIV immunogens delivered by Venezuelan equine encephalitis virus replicon particle vectors followed by a mucosal challenge with SIVsmE660. *Vaccine* **23**(42), 4969-79.
- Jones, K. E., Patel, N. G., Levy, M. A., Storeygard, A., Balk, D., Gittleman, J. L., and Daszak, P.** (2008). Global trends in emerging infectious diseases. *Nature* **451**(7181), 990-3.

- K -

- Kaiser, J.** (2003). Gene therapy. Seeking the cause of induced leukemias in X-SCID trial. *Science* **299**(5606), 495.
- Kaku, Y., Noguchi, A., Marsh, G. A., Barr, J. A., Okutani, A., Hotta, K., Bazartseren, B., Fukushima, S., Broder, C. C., Yamada, A., Inoue, S., and Wang, L. F.** (2012). Second generation of pseudotype-based serum neutralization assay for Nipah virus antibodies: sensitive and high-throughput analysis utilizing secreted alkaline phosphatase. *J Virol Methods* **179**(1), 226-32.
- Kang, S. M., Song, J. M., Quan, F. S., and Compans, R. W.** (2009). Influenza vaccines based on virus-like particles. *Virus Res* **143**(2), 140-6.
- Kay, M. A., Holterman, A. X., Meuse, L., Gown, A., Ochs, H. D., Linsley, P. S., and Wilson, C. B.** (1995). Long-term hepatic adenovirus-mediated gene expression in mice following LTCA4lg administration. *Nat Genet* **11**(2), 191-7.
- Kenne, E., Soehnlein, O., Genove, G., Rotzius, P., Eriksson, E. E., and Lindbom, L.** (2010). Immune cell recruitment to inflammatory loci is impaired in mice deficient in basement membrane protein laminin alpha4. *J Leukoc Biol* **88**(3), 523-8.
- Kew, O., Morris-Glasgow, V., Landaverde, M., Burns, C., Shaw, J., Garib, Z., Andre, J., Blackman, E., Freeman, C. J., Jorba, J., Sutter, R., Tambini, G., Venczel, L., Pedreira, C., Laender, F., Shimizu, H., Yoneyama, T., Miyamura, T., van Der Avoort, H., Oberste, M. S., Kilpatrick, D., Cochi, S., Pallansch, M., and de Quadros, C.** (2002). Outbreak of poliomyelitis in Hispaniola associated with circulating type 1 vaccine-derived poliovirus. *Science* **296**(5566), 356-9.
- Khetawat, D., and Broder, C. C.** (2010). A functional henipavirus envelope glycoprotein pseudotyped lentivirus assay system. *Virol J* **7**, 312.
- Kochanek, S.** (1999). High-capacity adenoviral vectors for gene transfer and somatic gene therapy. *Hum Gene Ther* **10**(15), 2451-9.
- Kotin, R. M.** (2011). Large-scale recombinant adeno-associated virus production. *Hum Mol Genet* **20**(R1), R2-6.
- Krasnykh, V. N., Douglas, J. T., and van Beusechem, V. W.** (2000). Genetic targeting of adenoviral vectors. *Mol Ther* **1**(5 Pt 1), 391-405.
- Kuck, D., Lau, T., Leuchs, B., Kern, A., Müller, M., Gissman, L., and Kleinschmidt, J. A.** (2006a). Intranasal vaccination with recombinant adeno-associated virus type 5 against human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* **80**(6), 2621-2630.
- Kuck, D., Lau, T., Leuchs, B., Kern, A., Muller, M., Gissmann, L., and Kleinschmidt, J. A.** (2006b). Intranasal vaccination with recombinant adeno-associated virus type 5 against human papillomavirus type 16 L1. *J Virol* **80**(6), 2621-30.

- L -

- Labow, M. A., Graf, L. H., Jr., and Berns, K. I.** (1987). Adeno-associated virus gene expression inhibits cellular transformation by heterologous genes. *Mol Cell Biol* **7**(4), 1320-5.
- Lai, Y., Yue, Y., Liu, M., Ghosh, A., Engelhardt, J. F., Chamberlain, J. S., and Duan, D.** (2005). Efficient in vivo gene expression by trans-splicing adeno-associated viral vectors. *Nat Biotechnol* **23**(11), 1435-9.
- Lam, S. K.** (2003). Nipah virus--a potential agent of bioterrorism? *Antiviral Res* **57**(1-2), 113-9.
- Lambert, D. M., Barney, S., Lambert, A. L., Guthrie, K., Medinas, R., Davis, D. E., Bucy, T., Erickson, J., Merutka, G., and Petteway, S. R., Jr.** (1996). Peptides from conserved regions of

- paramyxovirus fusion (F) proteins are potent inhibitors of viral fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(5), 2186-91.
- Lambert, P. H., and Laurent, P. E.** (2008). Intradermal vaccine delivery: will new delivery systems transform vaccine administration? *Vaccine* **26**(26), 3197-208.
- Lambert, P. H., and Parks, G. D.** (2007). Paramyxoviridae: The viruses and their replication. 5th ed. In "Fields virology", Vol. I, pp. 1449-1496. Wolters Kluwer Health/Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia.
- Lee, B., and Ataman, Z. A.** (2011). Modes of paramyxovirus fusion: a Henipavirus perspective. *Trends Microbiol* **19**(8), 389-99.
- Li, H., Malani, N., Hamilton, S. R., Schlachterman, A., Bussadori, G., Edmonson, S. E., Shah, R., Arruda, V. R., Mingozzi, F., Wright, J. F., Bushman, F. D., and High, K. A.** (2010). Assessing the potential for AAV vector genotoxicity in a murine model. *Blood* **117**(12), 3311-9.
- Li, W., Zhang, L., Johnson, J. S., Zhijian, W., Grieger, J. C., Ping-Jie, X., Drouin, L. M., Agbandje-McKenna, M., Pickles, R. J., and Samulski, R. J.** (2009). Generation of Novel AAV Variants by Directed Evolution for Improved CFTR Delivery to Human Ciliated Airway Epithelium. *Mol Ther*.
- Lin, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Bell, P., Somanathan, S., and Wilson, J. M.** (2009). A new genetic vaccine platform based on an adeno-associated virus isolated from a rhesus macaque. *J Virol*.
- Lin, J., Calcedo, R., Vandenberghe, L. H., Figueredo, J. M., and Wilson, J. M.** (2008). Impact of preexisting vector immunity on the efficacy of adeno-associated virus-based HIV-1 Gag vaccines. *Hum Gene Ther* **19**(7), 663-9.
- Lin, J., Zhi, Y., Mays, L., and Wilson, J. M.** (2007a). Vaccines based on novel adeno-associated virus vectors elicit aberrant CD8+ T-cell responses in mice. *J Virol* **81**(21), 11840-9.
- Lin, S. W., Hensley, S. E., Tatsis, N., Lasaro, M. O., and Ertl, H. C.** (2007b). Recombinant adeno-associated virus vectors induce functionally impaired transgene product-specific CD8+ T cells in mice. *J Clin Invest* **117**(12), 3958-70.
- Liu, D. W., Chang, J. L., Tsao, Y. P., Huang, C. W., Kuo, S. W., and Chen, S. L.** (2005a). Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int. J. Cancer* **113**, 93-100.
- Liu, D. W., Chang, J. L., Tsao, Y. P., Huang, C. W., Kuo, S. W., and Chen, S. L.** (2005b). Co-vaccination with adeno-associated virus vectors encoding human papillomavirus 16 L1 proteins and adenovirus encoding murine GM-CSF can elicit strong and prolonged neutralizing antibody. *Int J Cancer* **113**(1), 93-100.
- Liu, D. W., Tsao, Y. P., Kung, J. T., Ding, Y. A., Sytwu, H. K., Xiao, X., and Chen, S. L.** (2000). Recombinant adeno-associated virus expressing human papillomavirus type 16 E7 peptide DNA fused with heat shock protein DNA as a potential vaccine for cervical cancer. *J Virol* **74**(6), 2888-94.
- Liu, M. A.** (2010). Immunologic basis of vaccine vectors. *Immunity* **33**(4), 504-15.
- Liu, M. A.** (2011). DNA vaccines: an historical perspective and view to the future. *Immunol Rev* **239**(1), 62-84.
- Liu, X., Luo, M., Zhang, L. N., Yan, Z., Zak, R., Ding, W., Mansfield, S. G., Mitchell, L. G., and Engelhardt, J. F.** (2005c). Spliceosome-mediated RNA trans-splicing with recombinant adeno-associated virus partially restores cystic fibrosis transmembrane conductance regulator function to polarized human cystic fibrosis airway epithelial cells. *Hum Gene Ther* **16**(9), 1116-23.
- Logan, G. J., Wang, L., Zheng, M., Cunningham, S. C., Coppel, R. L., and Alexander, I. E.** (2007). AAV vectors encoding malarial antigens stimulate antigen-specific immunity but do not protect from parasite infection. *Vaccine* **25**(6), 1014-22.
- Lu, Y., and Song, S.** (2009). Distinct immune responses to transgene products from rAAV1 and rAAV8 vectors. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(40), 17158-62.

Luby, S. P., Hossain, M. J., Gurley, E. S., Ahmed, B. N., Banu, S., Khan, S. U., Homaira, N., Rota, P. A., Rollin, P. E., Comer, J. A., Kenah, E., Ksiazek, T. G., and Rahman, M. (2009). Recurrent zoonotic transmission of Nipah virus into humans, Bangladesh, 2001-2007. *Emerg Infect Dis* **15**(8), 1229-35.

- M -

MacDonald, G. H., and Johnston, R. E. (2000). Role of dendritic cell targeting in Venezuelan equine encephalitis virus pathogenesis. *J Virol* **74**(2), 914-22.

Mackenzie, J. S. (2005). Emerging zoonotic encephalitis viruses: lessons from Southeast Asia and Oceania. *J Neurovirol* **11**(5), 434-40.

Maelandsmo, G. M., Ross, P. J., Pavliv, M., Meulenbroek, R. A., Eveleigh, C., Muruve, D. A., Graham, F. L., and Parks, R. J. (2005). Use of a murine secreted alkaline phosphatase as a non-immunogenic reporter gene in mice. *J Gene Med* **7**(3), 307-15.

Manning, W. C., Paliard, X., Zhou, S., Pat Bland, M., Lee, A. Y., Hong, K., Walker, C. M., Escobedo, J. A., and Dwarki, V. (1997). Genetic immunization with adeno-associated virus vectors expressing herpes simplex virus type 2 glycoproteins B and D. *J Virol* **71**(10), 7960-2.

Manno, C. S., Pierce, G. F., Arruda, V. R., Glader, B., Ragni, M., Rasko, J. J., Ozelo, M. C., Hoots, K., Blatt, P., Konkle, B., Dake, M., Kaye, R., Razavi, M., Zajko, A., Zehnder, J., Rustagi, P. K., Nakai, H., Chew, A., Leonard, D., Wright, J. F., Lessard, R. R., Sommer, J. M., Tigges, M., Sabatino, D., Luk, A., Jiang, H., Mingozzi, F., Couto, L., Ertl, H. C., High, K. A., and Kay, M. A. (2006). Successful transduction of liver in hemophilia by AAV-Factor IX and limitations imposed by the host immune response. *Nat Med* **12**(3), 342-7.

Marianneau, P., Guillaume, V., Wong, T., Badmanathan, M., Looi, R. Y., Murri, S., Loth, P., Tordo, N., Wild, F., Horvat, B., and Contamin, H. (2010). Experimental infection of squirrel monkeys with nipah virus. *Emerg Infect Dis* **16**(3), 507-10.

Marino, M., Scuderi, F., Provenzano, C., and Bartoccioni, E. (2011). Skeletal muscle cells: from local inflammatory response to active immunity. *Gene Ther* **18**(2), 109-16.

Marsh, G. A., and Wang, L. F. (2012). Hendra and Nipah viruses: why are they so deadly? *Curr Opin Virol* **2**(3), 242-7.

Martinez, I., Rodriguez, L. L., Jimenez, C., Pauszek, S. J., and Wertz, G. W. (2003). Vesicular stomatitis virus glycoprotein is a determinant of pathogenesis in swine, a natural host. *J Virol* **77**(14), 8039-47.

Mathieu, C., Pohl, C., Szecei, J., Trajkovic-Bodennec, S., Devergnas, S., Raoul, H., Cosset, F. L., Gerlier, D., Wild, T. F., and Horvat, B. (2011). Nipah Virus Uses Leukocytes for Efficient Dissemination within a Host. *J Virol* **85**(15), 7863-71.

Matrai, J., Chuah, M. K., and VandenDriessche, T. (2010). Preclinical and clinical progress in hemophilia gene therapy. *Curr Opin Hematol* **17**(5), 387-92.

Mays, L. E., Vandenbergh, L. H., Xiao, R., Bell, P., Nam, H. J., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J. M. (2009). Adeno-associated virus capsid structure drives CD4-dependent CD8+ T cell response to vector encoded proteins. *J Immunol* **182**(10), 6051-60.

Mays, L. E., and Wilson, J. M. (2011). The complex and evolving story of T cell activation to AAV vector-encoded transgene products. *Mol Ther* **19**(1), 16-27.

McCarty, D. M., Fu, H., Monahan, P. E., Toulson, C. E., Naik, P., and Samulski, R. J. (2003). Adeno-associated virus terminal repeat (TR) mutant generates self-complementary vectors to overcome the rate-limiting step to transduction in vivo. *Gene Ther* **10**(26), 2112-8.

McCarty, D. M., Monahan, P. E., and Samulski, R. J. (2001). Self-complementary recombinant adeno-associated virus (scAAV) vectors promote efficient transduction independently of DNA synthesis. *Gene Ther* **8**(16), 1248-54.

McCown, T. J. (2011). Adeno-Associated Virus (AAV) Vectors in the CNS. *Curr Gene Ther* **11**(3), 181-8.

McEachern, J. A., Bingham, J., Cramer, G., Green, D. J., Hancock, T. J., Middleton, D., Feng, Y. R., Broder, C. C., Wang, L. F., and Bossart, K. N. (2008). A recombinant subunit vaccine formulation protects against lethal Nipah virus challenge in cats. *Vaccine* **26**(31), 3842-52.

- Melnick, J. L., Benyesh-Melnick, M., and Brennan, J. C.** (1959). Studies on live Poliovirus vaccine Its neurotropic activity in monkeys and its increased neurovirulence after multiplication in vaccinated children. *The journal of the American Medical Association, JAMA* **171**(9), 1165-1172.
- Mempel, M., Isa, G., Klugbauer, N., Meyer, H., Wildi, G., Ring, J., Hofmann, F., and Hofmann, H.** (2003). Laboratory acquired infection with recombinant vaccinia virus containing an immunomodulating construct. *J Invest Dermatol* **120**(3), 356-8.
- Michiels, A., Tuyaerts, S., Bonehill, A., Corthals, J., Breckpot, K., Heirman, C., Van Meirvenne, S., Dullaers, M., Allard, S., Brasseur, F., van der Bruggen, P., and Thielemans, K.** (2005). Electroporation of immature and mature dendritic cells: implications for dendritic cell-based vaccines. *Gene Ther* **12**(9), 772-82.
- Miller, D. G., Petek, L. M., and Russell, D. W.** (2004). Adeno-associated virus vectors integrate at chromosome breakage sites. *Nat Genet* **36**(7), 767-73.
- Mingozzi, F., and High, K. A.** (2011a). Immune responses to AAV in clinical trials. *Curr Gene Ther* **11**(4), 321-30.
- Mingozzi, F., and High, K. A.** (2011b). Therapeutic in vivo gene transfer for genetic disease using AAV: progress and challenges. *Nat Rev Genet* **12**(5), 341-55.
- Mingozzi, F., Liu, Y. L., Dobrzynski, E., Kaufhold, A., Liu, J. H., Wang, Y., Arruda, V. R., High, K. A., and Herzog, R. W.** (2003). Induction of immune tolerance to coagulation factor IX antigen by in vivo hepatic gene transfer. *J Clin Invest* **111**(9), 1347-56.
- Mingozzi, F., Maus, M. V., Hui, D. J., Sabatino, D. E., Murphy, S. L., Rasko, J. E., Ragni, M. V., Manno, C. S., Sommer, J., Jiang, H., Pierce, G. F., Ertl, H. C., and High, K. A.** (2007). CD8(+) T-cell responses to adeno-associated virus capsid in humans. *Nat Med* **13**(4), 419-22.
- Mohd Nor, M. N., Gan, C. H., and Ong, B. L.** (2000). Nipah virus infection of pigs in peninsular Malaysia. *Rev Sci Tech* **19**(1), 160-5.
- Morens, D. M., Folkers, G. K., and Fauci, A. S.** (2004). The challenge of emerging and re-emerging infectious diseases. *Nature* **430**(6996), 242-9.
- Moskalenko, M., Chen, L., van Roey, M., Donahue, B. A., Snyder, R. O., McArthur, J. G., and Patel, S. D.** (2000). Epitope mapping of human anti-adeno-associated virus type 2 neutralizing antibodies: implications for gene therapy and virus structure. *J Virol* **74**(4), 1761-6.
- Moss, B.** (1996). Genetically engineered poxviruses for recombinant gene expression, vaccination, and safety. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**(21), 11341-8.
- Mounts, A. W., Kaur, H., Parashar, U. D., Ksiazek, T. G., Cannon, D., Arokiasamy, J. T., Anderson, L. J., and Lye, M. S.** (2001). A cohort study of health care workers to assess nosocomial transmissibility of Nipah virus, Malaysia, 1999. *J Infect Dis* **183**(5), 810-3.
- Mungall, B. A., Middleton, D., Crameri, G., Bingham, J., Halpin, K., Russell, G., Green, D., McEachern, J., Pritchard, L. I., Eaton, B. T., Wang, L. F., Bossart, K. N., and Broder, C. C.** (2006). Feline model of acute nipah virus infection and protection with a soluble glycoprotein-based subunit vaccine. *J Virol* **80**(24), 12293-302.
- Murphy, K., Travers, P., Walport, M., and Janeway, C.** (2008). "Janeway's immunobiology." 7th ed. Garland Science, New York.
- Murray, K., Rogers, R., Selvey, L., Selleck, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Hooper, P., and Westbury, H.** (1995a). A novel morbillivirus pneumonia of horses and its transmission to humans. *Emerg Infect Dis* **1**(1), 31-3.
- Murray, K., Selleck, P., Hooper, P., Hyatt, A., Gould, A., Gleeson, L., Westbury, H., Hiley, L., Selvey, L., Rodwell, B., and et al.** (1995b). A morbillivirus that caused fatal disease in horses and humans. *Science* **268**(5207), 94-7.
- Muruve, D. A., Cotter, M. J., Zaiss, A. K., White, L. R., Liu, Q., Chan, T., Clark, S. A., Ross, P. J., Meulenbroek, R. A., Maelandsmo, G. M., and Parks, R. J.** (2004). Helper-dependent adenovirus vectors elicit intact innate but attenuated adaptive host immune responses in vivo. *J Virol* **78**(11), 5966-72.
- Muzyczka, N., and Warrington, K. H., Jr.** (2005). Custom adeno-associated virus capsids: the next generation of recombinant vectors with novel tropism. *Hum Gene Ther* **16**(4), 408-16.

- Nakai, H., Storm, T. A., and Kay, M. A.** (2000). Recruitment of single-stranded recombinant adeno-associated virus vector genomes and intermolecular recombination are responsible for stable transduction of liver in vivo. *J Virol* **74**(20), 9451-63.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M. A.** (2001a). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J Virol* **75**(15), 6969-76.
- Nakai, H., Yant, S. R., Storm, T. A., Fuess, S., Meuse, L., and Kay, M. A.** (2001b). Extrachromosomal recombinant adeno-associated virus vector genomes are primarily responsible for stable liver transduction in vivo. *J. Virol.* **75**(15), 6969-6976.
- Nalca, A., and Zumbun, E. E.** (2010). ACAM2000: the new smallpox vaccine for United States Strategic National Stockpile. *Drug Des Devel Ther* **4**, 71-9.
- Nathwani, A. C., Tuddenham, E. G., Rangarajan, S., Rosales, C., McIntosh, J., Linch, D. C., Chowdary, P., Riddell, A., Pie, A. J., Harrington, C., O'Beirne, J., Smith, K., Pasi, J., Glader, B., Rustagi, P., Ng, C. Y., Kay, M. A., Zhou, J., Spence, Y., Morton, C. L., Allay, J., Coleman, J., Sleep, S., Cunningham, J. M., Srivastava, D., Basner-Tschakarjan, E., Mingozzi, F., High, K. A., Gray, J. T., Reiss, U. M., Nienhuis, A. W., and Davidoff, A. M.** (2011). Adenovirus-associated virus vector-mediated gene transfer in hemophilia B. *N Engl J Med* **365**(25), 2357-65.
- Negrete, O. A., Chu, D., Aguilar, H. C., and Lee, B.** (2007). Single amino acid changes in the Nipah and Hendra virus attachment glycoproteins distinguish ephrinB2 from ephrinB3 usage. *J Virol* **81**(19), 10804-14.
- Negrete, O. A., Levroney, E. L., Aguilar, H. C., Bertolotti-Ciarlet, A., Nazarian, R., Tajyar, S., and Lee, B.** (2005). EphrinB2 is the entry receptor for Nipah virus, an emergent deadly paramyxovirus. *Nature* **436**(7049), 401-5.
- Negrete, O. A., Wolf, M. C., Aguilar, H. C., Enterlein, S., Wang, W., Muhlberger, E., Su, S. V., Bertolotti-Ciarlet, A., Flick, R., and Lee, B.** (2006). Two key residues in ephrinB3 are critical for its use as an alternative receptor for Nipah virus. *PLoS Pathog* **2**(2), e7.
- Nestle, F. O., Di Meglio, P., Qin, J. Z., and Nickoloff, B. J.** (2009). Skin immune sentinels in health and disease. *Nat Rev Immunol* **9**(10), 679-91.
- Neumann, J., Stitz, J., Konig, R., Seibold, E., Norley, S., Flory, E., and Cichutek, K.** (2006). Retroviral vectors for vaccine development: induction of HIV-1-specific humoral and cellular immune responses in rhesus macaques using a novel MLV(HIV-1) pseudotype vector. *J Biotechnol* **124**(3), 615-25.
- Nichols, T. C., Dillow, A. M., Franck, H. W., Merricks, E. P., Raymer, R. A., Bellinger, D. A., Arruda, V. R., and High, K. A.** (2009). Protein replacement therapy and gene transfer in canine models of hemophilia A, hemophilia B, von willebrand disease, and factor VII deficiency. *Ilar J* **50**(2), 144-67.
- Nicolas, A., Alazard-Dany, N., Biollay, C., Arata, L., Jolinon, N., Kuhn, L., Ferro, M., Weller, S. K., Epstein, A. L., Salvetti, A., and Greco, A.** (2010). Identification of rep-associated factors in herpes simplex virus type 1-induced adeno-associated virus type 2 replication compartments. *J Virol* **84**(17), 8871-87.
- Nieto, K., Kern, A., Leuchs, B., Gissmann, L., Muller, M., and Kleinschmidt, J. A.** (2009). Combined prophylactic and therapeutic intranasal vaccination against human papillomavirus type-16 using different adeno-associated virus serotype vectors. *Antivir Ther* **14**(8), 1125-37.
- Nieto, K., Stahl-Hennig, C., Leuchs, B., Muller, M., Gissmann, L., and Kleinschmidt, J. A.** (2012). Intranasal Vaccination with AAV5 and 9 Vectors Against Human Papillomavirus Type 16 in Rhesus Macaques. *Hum Gene Ther.*
- Nonnenmacher, M., and Weber, T.** (2012). Intracellular transport of recombinant adeno-associated virus vectors. *Gene Ther* **19**(6), 649-58.
- Noro, T., Miyake, K., Suzuki-Miyake, N., Igarashi, T., Uchida, E., Misawa, T., Yamazaki, Y., and Shimada, T.** (2004). Adeno-associated viral vector-mediated expression of endostatin inhibits

tumor growth and metastasis in an orthotropic pancreatic cancer model in hamsters. *Cancer Res* **64**(20), 7486-90.

- O -

O'Sullivan, J. D., Allworth, A. M., Paterson, D. L., Snow, T. M., Boots, R., Gleeson, L. J., Gould, A. R., Hyatt, A. D., and Bradfield, J. (1997). Fatal encephalitis due to novel paramyxovirus transmitted from horses. *Lancet* **349**(9045), 93-5.

Ota, M. O., Ndhlovu, Z., Oh, S., Piyasirisilp, S., Berzofsky, J. A., Moss, W. J., and Griffin, D. E. (2007). Hemagglutinin protein is a primary target of the measles virus-specific HLA-A2-restricted CD8+ T cell response during measles and after vaccination. *J Infect Dis* **195**(12), 1799-807.

- P -

Padalko, E., Nuyens, D., De Palma, A., Verbeken, E., Aerts, J. L., De Clercq, E., Carmeliet, P., and Neyts, J. (2004). The interferon inducer amplitgen [poly(I)-poly(C12U)] markedly protects mice against coxsackie B3 virus-induced myocarditis. *Antimicrob Agents Chemother* **48**(1), 267-74.

Pallister, J., Middleton, D., Broder, C., and Wang, L. (2011a). Henipavirus Vaccin Development. *J Bioterr Biodef*(S1:005).

Pallister, J., Middleton, D., Crameri, G., Yamada, M., Klein, R., Hancock, T. J., Foord, A., Shiell, B., Michalski, W., Broder, C. C., and Wang, L. F. (2009). Chloroquine administration does not prevent Nipah virus infection and disease in ferrets. *J Virol* **83**(22), 11979-82.

Pallister, J., Middleton, D., Wang, L. F., Klein, R., Haining, J., Robinson, R., Yamada, M., White, J., Payne, J., Feng, Y. R., Chan, Y. P., and Broder, C. C. (2011b). A recombinant Hendra virus G glycoprotein-based subunit vaccine protects ferrets from lethal Hendra virus challenge. *Vaccine* **29**(34), 5623-30.

Panicali, D., and Paoletti, E. (1982). Construction of poxviruses as cloning vectors: insertion of the thymidine kinase gene from herpes simplex virus into the DNA of infectious vaccinia virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **79**(16), 4927-31.

Parashar, U. D., Sunn, L. M., Ong, F., Mounts, A. W., Arif, M. T., Ksiazek, T. G., Kamaluddin, M. A., Mustafa, A. N., Kaur, H., Ding, L. M., Othman, G., Radzi, H. M., Kitsutani, P. T., Stockton, P. C., Arokiasamy, J., Gary, H. E., Jr., and Anderson, L. J. (2000). Case-control study of risk factors for human infection with a new zoonotic paramyxovirus, Nipah virus, during a 1998-1999 outbreak of severe encephalitis in Malaysia. *J Infect Dis* **181**(5), 1755-9.

Pascolo, S. (2006). Vaccination with messenger RNA. *Methods Mol Med* **127**, 23-40.

Pastoret, P. P., and Vanderplasschen, A. (2003). Poxviruses as vaccine vectors. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis* **26**(5-6), 343-55.

Patch, J. R., Crameri, G., Wang, L. F., Eaton, B. T., and Broder, C. C. (2007). Quantitative analysis of Nipah virus proteins released as virus-like particles reveals central role for the matrix protein. *Virology* **4**, 1.

Patterson, C. E., Lawrence, D. M., Echols, L. A., and Rall, G. F. (2002). Immune-mediated protection from measles virus-induced central nervous system disease is noncytolytic and gamma interferon dependent. *J Virol* **76**(9), 4497-506.

Penaud-Budloo, M., Le Guiner, C., Nowrouzi, A., Toromanoff, A., Cherel, Y., Chenuaud, P., Schmidt, M., von Kalle, C., Rolling, F., Moullier, P., and Snyder, R. O. (2008). Adeno-associated virus vector genomes persist as episomal chromatin in primate muscle. *J Virol* **82**(16), 7875-85.

Perabo, L., Buning, H., Kofler, D. M., Ried, M. U., Girod, A., Wendtner, C. M., Enssle, J., and Hallek, M. (2003). In vitro selection of viral vectors with modified tropism: the adeno-associated virus display. *Mol Ther* **8**(1), 151-7.

Perkus, M. E., Piccini, A., Lipinkas, B. R., and Paoletti, E. (1985). Recombinant vaccinia virus: immunization against multiple pathogens. *Science* **229**(4717), 981-4.

Pernet, O., Pohl, C., Ainouze, M., Kweder, H., and Buckland, R. (2009). Nipah virus entry can occur by macropinocytosis. *Virology* **395**(2), 298-311.

- Petajaniemi, N., Korhonen, M., Korttesmaa, J., Tryggvason, K., Sekiguchi, K., Fujiwara, H., Sorokin, L., Thornell, L. E., Wondimu, Z., Assefa, D., Patarroyo, M., and Virtanen, I.** (2002). Localization of laminin alpha4-chain in developing and adult human tissues. *J Histochem Cytochem* **50**(8), 1113-30.
- Pincha, M., Sundarasetty, B. S., and Stripecke, R.** (2010). Lentiviral vectors for immunization: an inflammatory field. *Expert Rev Vaccines* **9**(3), 309-21.
- Pitisuttithum, P., Rerks-Ngarm, S., Bussaratid, V., Dhitavat, J., Maekanantawat, W., Pungpak, S., Suntharasamai, P., Vanijanonta, S., Nitayapan, S., Kaewkungwal, J., Benenson, M., Morgan, P., O'Connell, R. J., Berenberg, J., Gurunathan, S., Francis, D. P., Paris, R., Chiu, J., Stablein, D., Michael, N. L., Excler, J. L., Robb, M. L., and Kim, J. H.** (2011). Safety and reactogenicity of canarypox ALVAC-HIV (vCP1521) and HIV-1 gp120 AIDSVAX B/E vaccination in an efficacy trial in Thailand. *PLoS One* **6**(12), e27837.
- Playford, E. G., McCall, B., Smith, G., Slinko, V., Allen, G., Smith, I., Moore, F., Taylor, C., Kung, Y. H., and Field, H.** (2010). Human Hendra virus encephalitis associated with equine outbreak, Australia, 2008. *Emerg Infect Dis* **16**(2), 219-23.
- Poulet, H., Minke, J., Pardo, M. C., Juillard, V., Nordgren, B., and Audonnet, J. C.** (2007). Development and registration of recombinant veterinary vaccines. The example of the canarypox vector platform. *Vaccine* **25**(30), 5606-12.
- Publicover, J., Ramsburg, E., and Rose, J. K.** (2004). Characterization of nonpathogenic, live, viral vaccine vectors inducing potent cellular immune responses. *J Virol* **78**(17), 9317-24.
- Pushko, P., Parker, M., Ludwig, G. V., Davis, N. L., Johnston, R. E., and Smith, J. F.** (1997). Replicon-helper systems from attenuated Venezuelan equine encephalitis virus: expression of heterologous genes in vitro and immunization against heterologous pathogens in vivo. *Virology* **239**(2), 389-401.

- R -

- Rahman, S. A., Hassan, S. S., Olival, K. J., Mohamed, M., Chang, L. Y., Hassan, L., Saad, N. M., Shohaimi, S. A., Mamat, Z. C., Naim, M. S., Epstein, J. H., Suri, A. S., Field, H. E., and Daszak, P.** (2010). Characterization of Nipah virus from naturally infected Pteropus vampyrus bats, Malaysia. *Emerg Infect Dis* **16**(12), 1990-3.
- Rajput, Z. I., Hu, S. H., Xiao, C. W., and Arijo, A. G.** (2007). Adjuvant effects of saponins on animal immune responses. *J Zhejiang Univ Sci B* **8**(3), 153-61.
- Ramasundrum, V., Tan, C. T., Chong, H. T., Goh, K. J., Chew, N. K., Petharunam, V., Thayaparan, T., Chua, K. B., Lam, S. K., and Ksiazek, T. G.** (1999). Presence of GSF IgM do not have protective effect in Nipah encephalitis. *Neurol J Southeast Asia* **4**, 73-76.
- Randrianarison-Jewtoukoff, V., and Perricaudet, M.** (1995). Recombinant adenoviruses as vaccines. *Biologicals* **23**(2), 145-57.
- Raper, S. E., Chirmule, N., Lee, F. S., Wivel, N. A., Bagg, A., Gao, G. P., Wilson, J. M., and Batshaw, M. L.** (2003). Fatal systemic inflammatory response syndrome in a ornithine transcarbamylase deficient patient following adenoviral gene transfer. *Mol Genet Metab* **80**(1-2), 148-58.
- Rappuoli, R.** (2007). Bridging the knowledge gaps in vaccine design. *Nat Biotechnol* **25**(12), 1361-6.
- Reich, S. J., Auricchio, A., Hildinger, M., Glover, E., Maguire, A. M., Wilson, J. M., and Bennett, J.** (2003). Efficient trans-splicing in the retina expands the utility of adeno-associated virus as a vector for gene therapy. *Hum Gene Ther* **14**(1), 37-44.
- Reynes, J. M., Counor, D., Ong, S., Faure, C., Seng, V., Molia, S., Walston, J., Georges-Courbot, M. C., Deubel, V., and Sarthou, J. L.** (2005). Nipah virus in Lyle's flying foxes, Cambodia. *Emerg Infect Dis* **11**(7), 1042-7.
- Roberts, A., Buonocore, L., Price, R., Forman, J., and Rose, J. K.** (1999). Attenuated vesicular stomatitis viruses as vaccine vectors. *J Virol* **73**(5), 3723-32.
- Roberts, A., Kretzschmar, E., Perkins, A. S., Forman, J., Price, R., Buonocore, L., Kawaoka, Y., and Rose, J. K.** (1998). Vaccination with a recombinant vesicular stomatitis virus expressing an

- influenza virus hemagglutinin provides complete protection from influenza virus challenge. *J Virol* **72**(6), 4704-11.
- Rockx, B., Bossart, K. N., Feldmann, F., Geisbert, J. B., Hickey, A. C., Brining, D., Callison, J., Safronetz, D., Marzi, A., Kercher, L., Long, D., Broder, C. C., Feldmann, H., and Geisbert, T. W. (2010). A novel model of lethal Hendra virus infection in African green monkeys and the effectiveness of ribavirin treatment. *J Virol* **84**(19), 9831-9.
- Rockx, B., Brining, D., Kramer, J., Callison, J., Ebihara, H., Mansfield, K., and Feldmann, H. (2011). Clinical outcome of henipavirus infection in hamsters is determined by the route and dose of infection. *J Virol* **85**(15), 7658-71.
- Rogers, G. L., Martino, A. T., Aslanidi, G. V., Jayandharan, G. R., Srivastava, A., and Herzog, R. W. (2011). Innate Immune Responses to AAV Vectors. *Front Microbiol* **2**, 194.
- Rose, N. F., Marx, P. A., Luckay, A., Nixon, D. F., Moretto, W. J., Donahoe, S. M., Montefiori, D., Roberts, A., Buonocore, L., and Rose, J. K. (2001). An effective AIDS vaccine based on live attenuated vesicular stomatitis virus recombinants. *Cell* **106**(5), 539-49.
- Rose, N. F., Roberts, A., Buonocore, L., and Rose, J. K. (2000). Glycoprotein exchange vectors based on vesicular stomatitis virus allow effective boosting and generation of neutralizing antibodies to a primary isolate of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol* **74**(23), 10903-10.
- Rotundo, I. L., Faraso, S., De Leonibus, E., Nigro, G., Vitiello, C., Lancioni, A., Di Napoli, D., Castaldo, S., Russo, V., Russo, F., Piluso, G., Auricchio, A., and Nigro, V. (2011). Worsening of cardiomyopathy using deflazacort in an animal model rescued by gene therapy. *PLoS One* **6**(9), e24729.
- Roy, P., and Noad, R. (2008). Virus-like particles as a vaccine delivery system: myths and facts. *Hum Vaccin* **4**(1), 5-12.
- Rubin, H. (2011). The early history of tumor virology: Rous, RIF, and RAV. *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(35), 14389-96.
- S -
- Saade, F., and Petrovsky, N. (2012). Technologies for enhanced efficacy of DNA vaccines. *Expert Rev Vaccines* **11**(2), 189-209.
- Sabatino, D. E., Lange, A. M., Altynova, E. S., Sarkar, R., Zhou, S., Merricks, E. P., Franck, H. G., Nichols, T. C., Arruda, V. R., and Kazazian, H. H., Jr. (2011). Efficacy and safety of long-term prophylaxis in severe hemophilia A dogs following liver gene therapy using AAV vectors. *Mol Ther* **19**(3), 442-9.
- Sakuma, T., Barry, M. A., and Ikeda, Y. (2012). Lentiviral vectors: basic to translational. *Biochem J* **443**(3), 603-18.
- Salvetti, A., Orève, S., Chadeuf, G., Favre, D., Cherel, Y., Champion-Arnaud, P., David-Ameline, J., and Moullier, P. (1998). Factors influencing recombinant adeno-associated virus production. *Hum. Gene Ther.* **9**(5), 695-706.
- Sanders, D. A. (2002). No false start for novel pseudotyped vectors. *Curr Opin Biotechnol* **13**(5), 437-42.
- Sanger, C., Muhlberger, E., Klenk, H. D., and Becker, S. (2001). Adverse effects of MVA-T7 on the transport of Marburg virus glycoprotein. *J Virol Methods* **91**(1), 29-35.
- Sarukhan, A., Soudais, C., Danos, O., and Jooss, K. (2001). Factors influencing cross-presentation of non-self antigens expressed from recombinant adeno-associated virus vectors. *J Gene Med* **3**(3), 260-70.
- Schlehofer, J. R., Ehrbar, M., and zur Hausen, H. (1986). Vaccinia virus, herpes simplex virus, and carcinogens induce DNA amplification in a human cell line and support replication of a helpervirus dependent parvovirus. *Virology* **152**(1), 110-7.
- Schlesinger, S., and Dubensky, T. W. (1999). Alphavirus vectors for gene expression and vaccines. *Curr Opin Biotechnol* **10**(5), 434-9.

- Schnell, M. A., Zhang, Y., Tazelaar, J., Gao, G. P., Yu, Q. C., Qian, R., Chen, S. J., Varnavski, A. N., LeClair, C., Raper, S. E., and Wilson, J. M.** (2001). Activation of innate immunity in nonhuman primates following intraportal administration of adenoviral vectors. *Mol Ther* **3**(5 Pt 1), 708-22.
- Schnepp, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A., and Johnson, P. R.** (2003a). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J. Virol.* **77**(6), 3495-3504.
- Schnepp, B. C., Clark, K. R., Klemanski, D. L., Pacak, C. A., and Johnson, P. R.** (2003b). Genetic fate of recombinant adeno-associated virus vector genomes in muscle. *J Virol* **77**(6), 3495-504.
- Schuettrumpf, J., Liu, J. H., Couto, L. B., Addya, K., Leonard, D. G., Zhen, Z., Sommer, J., and Arruda, V. R.** (2006). Inadvertent germline transmission of AAV2 vector: findings in a rabbit model correlate with those in a human clinical trial. *Mol Ther* **13**(6), 1064-73.
- Schultz-Cherry, S., Dybing, J. K., Davis, N. L., Williamson, C., Suarez, D. L., Johnston, R., and Perdue, M. L.** (2000). Influenza virus (A/HK/156/97) hemagglutinin expressed by an alphavirus replicon system protects chickens against lethal infection with Hong Kong-origin H5N1 viruses. *Virology* **278**(1), 55-9.
- Sedman, S. A., Barbosa, M. S., Vass, W. C., Hubbert, N. L., Haas, J. A., Lowy, D. R., and Schiller, J. T.** (1991). The full-length E6 protein of human papillomavirus type 16 has transforming and trans-activating activities and cooperates with E7 to immortalize keratinocytes in culture. *J Virol* **65**(9), 4860-6.
- Selvey, L. A., Wells, R. M., McCormack, J. G., Ansford, A. J., Murray, K., Rogers, R. J., Lavercombe, P. S., Selleck, P., and Sheridan, J. W.** (1995). Infection of humans and horses by a newly described morbillivirus. *Med J Aust* **162**(12), 642-5.
- Shen, S., Bryant, K. D., Brown, S. M., Randell, S. H., and Asokan, A.** (2011). Terminal N-linked galactose is the primary receptor for adeno-associated virus 9. *J Biol Chem* **286**(15), 13532-40.
- Siders, W. M., Shields, J., Kaplan, J., Lukason, M., Woodworth, L., Wadsworth, S., and Scaria, A.** (2009). Cytotoxic T lymphocyte responses to transgene product, not adeno-associated viral capsid protein, limit transgene expression in mice. *Hum Gene Ther* **20**(1), 11-20.
- Simonelli, F., Maguire, A. M., Testa, F., Pierce, E. A., Mingozi, F., Bennicelli, J. L., Rossi, S., Marshall, K., Banfi, S., Surace, E. M., Sun, J., Redmond, T. M., Zhu, X., Shindler, K. S., Ying, G. S., Ziviello, C., Acerra, C., Wright, J. F., McDonnell, J. W., High, K. A., Bennett, J., and Auricchio, A.** (2010). Gene therapy for Leber's congenital amaurosis is safe and effective through 1.5 years after vector administration. *Mol Ther* **18**(3), 643-50.
- Sinniah, M.** (1989). A review of Japanese-B virus encephalitis in Malaysia. *Southeast Asian J Trop Med Public Health* **20**(4), 581-5.
- Sipo, I., Knauf, M., Fechner, H., Poller, W., Planz, O., Kurth, R., and Norley, S.** (2010). Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* **29**(8), 1690-9.
- Sipo, I., Knauf, M., Fechner, H., Poller, W., Planz, O., Kurth, R., and Norley, S.** (2011). Vaccine protection against lethal homologous and heterologous challenge using recombinant AAV vectors expressing codon-optimized genes from pandemic swine origin influenza virus (SOIV). *Vaccine* **29**(8), 1690-9.
- Small, J. C., and Ertl, H. C.** (2011). Viruses - from Pathogens to Vaccine Carriers. *Curr Opin Virol* **1**(4), 241-245.
- Smith, G. L., Mackett, M., and Moss, B.** (1983). Infectious vaccinia virus recombinants that express hepatitis B virus surface antigen. *Nature* **302**(5908), 490-5.
- Smith, G. L., Murphy, B. R., and Moss, B.** (1983). Construction and characterization of an infectious vaccinia virus recombinant that expresses the influenza hemagglutinin gene and induces resistance to influenza virus infection in hamsters. *Proc Natl Acad Sci U S A* **80**(23), 7155-9.
- Snyder, R. O., and Flotte, T. R.** (2002). Production of clinical-grade recombinant adeno-associated virus vectors. *Curr Opin Biotechnol* **13**(5), 418-23.

- Sonntag, F., Schmidt, K., and Kleinschmidt, J. A. (2010). A viral assembly factor promotes AAV2 capsid formation in the nucleolus. *Proc Natl Acad Sci U S A*.
- Sorokin, L. M., Maley, M. A., Moch, H., von der Mark, H., von der Mark, K., Cadalbert, L., Karosi, S., Davies, M. J., McGeachie, J. K., and Grounds, M. D. (2000). Laminin alpha4 and integrin alpha6 are upregulated in regenerating dy/dy skeletal muscle: comparative expression of laminin and integrin isoforms in muscles regenerating after crush injury. *Exp Cell Res* **256**(2), 500-14.
- Stripecke, R., Carmen Villacres, M., Skelton, D., Satake, N., Halene, S., and Kohn, D. (1999). Immune response to green fluorescent protein: implications for gene therapy. *Gene Ther* **6**(7), 1305-12.
- Stubblefield Park, S. R., Widness, M., Levine, A. D., and Patterson, C. E. (2011). T cell-, interleukin-12-, and gamma interferon-driven viral clearance in measles virus-infected brain tissue. *J Virol* **85**(7), 3664-76.
- Sullivan, N. J., Hensley, L., Asiedu, C., Geisbert, T. W., Stanley, D., Johnson, J., Honko, A., Olinger, G., Bailey, M., Geisbert, J. B., Reimann, K. A., Bao, S., Rao, S., Roederer, M., Jahrling, P. B., Koup, R. A., and Nabel, G. J. (2011). CD8+ cellular immunity mediates rAd5 vaccine protection against Ebola virus infection of nonhuman primates. *Nat Med* **17**(9), 1128-31.
- Sutter, G., and Moss, B. (1992). Nonreplicating vaccinia vector efficiently expresses recombinant genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(22), 10847-51.
- Szecsi, J., Boson, B., Johnsson, P., Dupeyrot-Lacas, P., Matrosovich, M., Klenk, H. D., Klatzmann, D., Volchkov, V., and Cosset, F. L. (2006). Induction of neutralising antibodies by virus-like particles harbouring surface proteins from highly pathogenic H5N1 and H7N1 influenza viruses. *Virology* **3**, 70.
- Szecsi, J., Gabriel, G., Edfeldt, G., Michelet, M., Klenk, H. D., and Cosset, F. L. (2009). DNA vaccination with a single-plasmid construct coding for viruslike particles protects mice against infection with a highly pathogenic avian influenza A virus. *J Infect Dis* **200**(2), 181-90.

- T -

- Tamin, A., Harcourt, B. H., Ksiazek, T. G., Rollin, P. E., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2002). Functional properties of the fusion and attachment glycoproteins of Nipah virus. *Virology* **296**(1), 190-200.
- Tamin, A., Harcourt, B. H., Lo, M. K., Roth, J. A., Wolf, M. C., Lee, B., Weingartl, H., Audonnet, J. C., Bellini, W. J., and Rota, P. A. (2009). Development of a neutralization assay for Nipah virus using pseudotype particles. *J Virol Methods* **160**(1-2), 1-6.
- Tan, C. T., Goh, K. J., Wong, K. T., Sarji, S. A., Chua, K. B., Chew, N. K., Murugasu, P., Loh, Y. L., Chong, H. T., Tan, K. S., Thayaparan, T., Kumar, S., and Jusoh, M. R. (2002). Relapsed and late-onset Nipah encephalitis. *Ann Neurol* **51**(6), 703-8.
- Tan, K. S., Tan, C. T., and Goh, K. J. (1999). Epidemiological aspects of Nipah virus infection. *Neurol J Southeast Asia* **4**, 77-81.
- Tatsis, N., and Ertl, H. C. (2004). Adenoviruses as vaccine vectors. *Mol Ther* **10**(4), 616-29.
- Tatsis, N., Lasaro, M. O., Lin, S. W., Haut, L. H., Xiang, Z. Q., Zhou, D., Dimenna, L., Li, H., Bian, A., Abdulla, S., Li, Y., Giles-Davis, W., Engram, J., Ratcliffe, S. J., Silvestri, G., Ertl, H. C., and Betts, M. R. (2009). Adenovirus vector-induced immune responses in nonhuman primates: responses to prime boost regimens. *J Immunol* **182**(10), 6587-99.
- Thomas, C. E., Storm, T. A., Huang, Z., and Kay, M. A. (2004). Rapid uncoating of vector genomes is the key to efficient liver transduction with pseudotyped adeno-associated virus vectors. *J Virol* **78**(6), 3110-22.
- Thomson, B. J., Weindler, F. W., Gray, D., Schwaab, V., and Heilbronn, R. (1994). Human herpesvirus 6 (HHV-6) is a helper virus for adeno-associated virus type 2 (AAV-2) and the AAV-2 rep gene homologue in HHV-6 can mediate AAV-2 DNA replication and regulate gene expression. *Virology* **204**(1), 304-11.

- Torres-Velez, F. J., Shieh, W. J., Rollin, P. E., Morken, T., Brown, C., Ksiazek, T. G., and Zaki, S. R.** (2008). Histopathologic and immunohistochemical characterization of Nipah virus infection in the guinea pig. *Vet Pathol* **45**(4), 576-85.
- Toth, J., Cutforth, T., Gelinas, A. D., Bethoney, K. A., Bard, J., and Harrison, C. J.** (2001). Crystal structure of an ephrin ectodomain. *Dev Cell* **1**(1), 83-92.

- V -

- Valen, L. V.** (1973). A new evolutionary law. *Evolutionary Theory* **1**, 1-30.
- Vandenberghe, L. H., Breous, E., Nam, H. J., Gao, G., Xiao, R., Sandhu, A., Johnston, J., Debyser, Z., Agbandje-McKenna, M., and Wilson, J. M.** (2009). Naturally occurring singleton residues in AAV capsid impact vector performance and illustrate structural constraints. *Gene Ther* **16**(12), 1416-28.
- Veron, P., Allo, V., Riviere, C., Bernard, J., Douar, A. M., and Masurier, C.** (2007). Major subsets of human dendritic cells are efficiently transduced by self-complementary adeno-associated virus vectors 1 and 2. *J Virol* **81**(10), 5385-94.
- Vincent-Lacaze, N., Snyder, R. O., Gluzman, R., Bohl, D., Lagarde, C., and Danos, O.** (1999). Structure of adeno-associated virus vector DNA following transduction of the skeletal muscle. *J Virol* **73**(3), 1949-55.
- Vitiello, C., Faraso, S., Sorrentino, N. C., Di Salvo, G., Nusco, E., Nigro, G., Cuttillo, L., Calabro, R., Auricchio, A., and Nigro, V.** (2009). Disease rescue and increased lifespan in a model of cardiomyopathy and muscular dystrophy by combined AAV treatments. *PLoS One* **4**(3), e5051.

- W -

- Walpita, P., Barr, J., Sherman, M., Basler, C. F., and Wang, L.** (2011). Vaccine potential of Nipah virus-like particles. *PLoS One* **6**(4), e18437.
- Walsh, S. R., and Dolin, R.** (2011). Vaccinia viruses: vaccines against smallpox and vectors against infectious diseases and tumors. *Expert Rev Vaccines* **10**(8), 1221-40.
- Walz, C., Deprez, A., Dupressoir, T., Durst, M., Rabreau, M., and Schlehofer, J. R.** (1997). Interaction of human papillomavirus type 16 and adeno-associated virus type 2 co-infecting human cervical epithelium. *J Gen Virol* **78** (Pt 6), 1441-52.
- Wang, J., Xie, J., Lu, H., Chen, L., Hauck, B., Samulski, R. J., and Xiao, W.** (2007). Existence of transient functional double-stranded DNA intermediates during recombinant AAV transduction. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(32), 13104-9.
- Wang, L., Calcedo, R., Wang, H., Bell, P., Grant, R., Vandenberghe, L. H., Sanmiguel, J., Morizono, H., Batshaw, M. L., and Wilson, J. M.** (2010). The pleiotropic effects of natural AAV infections on liver-directed gene transfer in macaques. *Mol Ther* **18**(1), 126-34.
- Wang, L., Harcourt, B. H., Yu, M., Tamin, A., Rota, P. A., Bellini, W. J., and Eaton, B. T.** (2001). Molecular biology of Hendra and Nipah viruses. *Microbes Infect* **3**(4), 279-87.
- Wang, X., Ge, J., Hu, S., Wang, Q., Wen, Z., Chen, H., and Bu, Z.** (2006). Efficacy of DNA immunization with F and G protein genes of Nipah virus. *Ann N Y Acad Sci* **1081**, 243-5.
- Wang, Z., Ma, H. I., Li, J., Sun, L., Zhang, J., and Xiao, X.** (2003). Rapid and highly efficient transduction by double-stranded adeno-associated virus vectors in vitro and in vivo. *Gene Ther* **10**(26), 2105-11.
- Warfield, K. L., and Olinger, G. G.** (2011). Protective role of cytotoxic T lymphocytes in filovirus hemorrhagic fever. *J Biomed Biotechnol* **2011**, 984241.
- Weaver, E. A., Nehete, P. N., Buchl, S. S., Senac, J. S., Palmer, D., Ng, P., Sastry, K. J., and Barry, M. A.** (2009). Comparison of replication-competent, first generation, and helper-dependent adenoviral vaccines. *PLoS One* **4**(3), e5059.
- Weaver, S. C., Ferro, C., Barrera, R., Boshell, J., and Navarro, J. C.** (2004). Venezuelan equine encephalitis. *Annu Rev Entomol* **49**, 141-74.

- Weingartl, H. M., Berhane, Y., Caswell, J. L., Loosmore, S., Audonnet, J. C., Roth, J. A., and Czub, M. (2006). Recombinant nipah virus vaccines protect pigs against challenge. *J Virol* **80**(16), 7929-38.
- Weyer, J., Rupprecht, C. E., and Nel, L. H. (2009). Poxvirus-vectored vaccines for rabies--a review. *Vaccine* **27**(51), 7198-201.
- WHO, W. H. O. (2004). Nipah virus outbreak(s) in Bangladesh, January–April 2004. *Weekly epidemiological record from WHO* **N°17**(79th year), 168-171.
- Williamson, M. M., Hooper, P. T., Selleck, P. W., Gleeson, L. J., Daniels, P. W., Westbury, H. A., and Murray, P. K. (1998). Transmission studies of Hendra virus (equine morbillivirus) in fruit bats, horses and cats. *Aust Vet J* **76**(12), 813-8.
- Williamson, M. M., and Torres-Velez, F. J. (2010). Henipavirus: a review of laboratory animal pathology. *Vet Pathol* **47**(5), 871-80.
- Wilson, J. M. (1996). Adenoviruses as gene-delivery vehicles. *N Engl J Med* **334**(18), 1185-7.
- Wong, K. T. (2010). Emerging epidemic viral encephalitides with a special focus on henipaviruses. *Acta Neuropathol* **120**(3), 317-25.
- Wong, K. T., Grosjean, I., Brisson, C., Blanquier, B., Fevre-Montange, M., Bernard, A., Loth, P., Georges-Courbot, M. C., Chevallier, M., Akaoka, H., Marianneau, P., Lam, S. K., Wild, T. F., and Deubel, V. (2003). A golden hamster model for human acute Nipah virus infection. *Am J Pathol* **163**(5), 2127-37.
- Wong, K. T., Shieh, W. J., Kumar, S., Norain, K., Abdullah, W., Guarner, J., Goldsmith, C. S., Chua, K. B., Lam, S. K., Tan, C. T., Goh, K. J., Chong, H. T., Jusoh, R., Rollin, P. E., Ksiazek, T. G., and Zaki, S. R. (2002). Nipah virus infection: pathology and pathogenesis of an emerging paramyxoviral zoonosis. *Am J Pathol* **161**(6), 2153-67.
- Wright, P. J., Cramer, G., and Eaton, B. T. (2005). RNA synthesis during infection by Hendra virus: an examination by quantitative real-time PCR of RNA accumulation, the effect of ribavirin and the attenuation of transcription. *Arch Virol* **150**(3), 521-32.
- Wu, J., Zhao, W., Zhong, L., Han, Z., Li, B., Ma, W., Weigel-Kelley, K. A., Warrington, K. H., and Srivastava, A. (2007). Self-complementary recombinant adeno-associated viral vectors: packaging capacity and the role of rep proteins in vector purity. *Hum Gene Ther* **18**(2), 171-82.
- Wu, Z., Asokan, A., and Samulski, R. J. (2006). Adeno-associated virus serotypes: vector toolkit for human gene therapy. *Mol Ther* **14**(3), 316-27.

- X -

- Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G., and Wilson, J. M. (1999a). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**(5), 3994-4003.
- Xiao, W., Chirmule, N., Berta, S. C., McCullough, B., Gao, G., and Wilson, J. M. (1999b). Gene therapy vectors based on adeno-associated virus type 1. *J Virol* **73**, 3994-4003.
- Xiao, X., Li, J., and Samulski, R. J. (1998). Production of high-titer recombinant Adeno-Associated Virus vectors in the absence of helper adenovirus. *J. Virol.* **72**, 2224-2232.
- Xie, Q., Bu, W., Bhatia, S., Hare, J., Somasundaram, T., Azzi, A., and Chapman, M. S. (2002). The atomic structure of adeno-associated virus (AAV-2), a vector for human gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **99**(16), 10405-10.
- Xin, K. Q., Mizukami, H., Urabe, M., Toda, Y., Shinoda, K., Yoshida, A., Oomura, K., Kojima, Y., Ichino, M., Klinman, D., Ozawa, K., and Okuda, K. (2006). Induction of robust immune responses against human immunodeficiency virus is supported by the inherent tropism of adeno-associated virus type 5 for dendritic cells. *J Virol* **80**(24), 11899-910.
- Xin, K. Q., Ooki, T., Mizukami, H., Hamajima, K., Okudela, K., Hashimoto, K., Kojima, Y., Jounai, N., Kumamoto, Y., Sasaki, S., Klinman, D., Ozawa, K., and Okuda, K. (2002). Oral administration of recombinant adeno-associated virus elicits human immunodeficiency virus-specific immune responses. *Hum Gene Ther* **13**(13), 1571-81.

- Xin, K. Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiya, K., Mizukami, H., Hamajima, H., Nomiya, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., and Okuda, K.** (2001a). A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum. Gene Ther.* **12**, 1047-1061.
- Xin, K. Q., Urabe, M., Yang, J., Nomiya, K., Mizukami, H., Hamajima, K., Nomiya, H., Saito, T., Imai, M., Monahan, J., Okuda, K., Ozawa, K., and Okuda, K.** (2001b). A novel recombinant adeno-associated virus vaccine induces a long-term humoral immune response to human immunodeficiency virus. *Hum Gene Ther* **12**(9), 1047-61.
- Xu, K., Broder, C. C., and Nikolov, D. B.** (2012). Ephrin-B2 and ephrin-B3 as functional henipavirus receptors. *Semin Cell Dev Biol* **23**(1), 116-23.

- Y -

- Yang, G. S., Schmidt, M., Yan, Z., Lindbloom, J. D., Harding, T. C., Donahue, B. A., Engelhardt, J. F., Kotin, R., and Davidson, B. L.** (2002). Virus-mediated transduction of murine retina with adeno-associated virus: effects of viral capsid and genome size. *J Virol* **76**(15), 7651-60.
- Yang, Y., Jooss, K. U., Su, Q., Ertl, H. C., and Wilson, J. M.** (1996). Immune responses to viral antigens versus transgene product in the elimination of recombinant adenovirus-infected hepatocytes in vivo. *Gene Ther* **3**(2), 137-44.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Furth, E. E., Gonczol, E., and Wilson, J. M.** (1994a). Cellular immunity to viral antigens limits E1-deleted adenoviruses for gene therapy. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(10), 4407-11.
- Yang, Y., Nunes, F. A., Berencsi, K., Gonczol, E., Engelhardt, J. F., and Wilson, J. M.** (1994b). Inactivation of E2a in recombinant adenoviruses improves the prospect for gene therapy in cystic fibrosis. *Nat Genet* **7**(3), 362-9.
- Yi, Y., Noh, M. J., and Lee, K. H.** (2011). Current advances in retroviral gene therapy. *Curr Gene Ther* **11**(3), 218-28.
- Yob, J. M., Field, H., Rashdi, A. M., Morrissy, C., van der Heide, B., Rota, P., bin Adzhar, A., White, J., Daniels, P., Jamaluddin, A., and Ksiazek, T.** (2001). Nipah virus infection in bats (order Chiroptera) in peninsular Malaysia. *Emerg Infect Dis* **7**(3), 439-41.
- Young, K. R., McBurney, S. P., Karkhanis, L. U., and Ross, T. M.** (2006). Virus-like particles: designing an effective AIDS vaccine. *Methods* **40**(1), 98-117.
- Young, P. L., Halpin, K., Selleck, P. W., Field, H., Gravel, J. L., Kelly, M. A., and Mackenzie, J. S.** (1996). Serologic evidence for the presence in Pteropus bats of a paramyxovirus related to equine morbillivirus. *Emerg Infect Dis* **2**(3), 239-40.
- Yu, M., Hansson, E., Shiell, B., Michalski, W., Eaton, B. T., and Wang, L. F.** (1998). Sequence analysis of the Hendra virus nucleoprotein gene: comparison with other members of the subfamily Paramyxovirinae. *J Gen Virol* **79** (Pt 7), 1775-80.

- Z -

- Zaiss, A. K., Cotter, M. J., White, L. R., Clark, S. A., Wong, N. C., Holers, V. M., Bartlett, J. S., and Muruve, D. A.** (2008). Complement is an essential component of the immune response to adeno-associated virus vectors. *J Virol* **82**(6), 2727-40.
- Zaiss, A. K., Liu, Q., Bowen, G. P., Wong, N. C., Bartlett, J. S., and Muruve, D. A.** (2002). Differential activation of innate immune responses by adenovirus and adeno-associated virus vectors. *J Virol* **76**(9), 4580-90.
- Zaiss, A. K., and Muruve, D. A.** (2008). Immunity to adeno-associated virus vectors in animals and humans: a continued challenge. *Gene Ther* **15**(11), 808-16.
- Zhang, Y., Chirmule, N., Gao, G. P., Qian, R., Croyle, M., Joshi, B., Tazelaar, J., and Wilson, J. M.** (2001). Acute cytokine response to systemic adenoviral vectors in mice is mediated by dendritic cells and macrophages. *Mol Ther* **3**(5 Pt 1), 697-707.

- Zhong, L., Zhou, X., Li, Y., Qing, K., Xiao, X., Samulski, R. J., and Srivastava, A.** (2008). Single-polarity recombinant adeno-associated virus 2 vector-mediated transgene expression in vitro and in vivo: mechanism of transduction. *Mol Ther* **16**(2), 290-5.
- Zhou, L., Zhu, T., Ye, X., Yang, L., Wang, B., Liang, X., Lu, L., Tsao, Y. P., Chen, S. L., Li, J., and Xiao, X.** (2010). Long-term protection against human papillomavirus e7-positive tumor by a single vaccination of adeno-associated virus vectors encoding a fusion protein of inactivated e7 of human papillomavirus 16/18 and heat shock protein 70. *Hum Gene Ther* **21**(1), 109-19.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y.** (2007). Innate immune response to adenoviral vectors is mediated by both Toll-like receptor-dependent and -independent pathways. *J Virol* **81**(7), 3170-80.
- Zhu, J., Huang, X., and Yang, Y.** (2009). The TLR9-MyD88 pathway is critical for adaptive immune responses to adeno-associated virus gene therapy vectors in mice. *J Clin Invest* **119**(8), 2388-98.
- Zhu, Z., Bossart, K. N., Bishop, K. A., Crameri, G., Dimitrov, A. S., McEachern, J. A., Feng, Y., Middleton, D., Wang, L. F., Broder, C. C., and Dimitrov, D. S.** (2008). Exceptionally potent cross-reactive neutralization of Nipah and Hendra viruses by a human monoclonal antibody. *J Infect Dis* **197**(6), 846-53.
- Zhu, Z., Dimitrov, A. S., Bossart, K. N., Crameri, G., Bishop, K. A., Choudhry, V., Mungall, B. A., Feng, Y. R., Choudhary, A., Zhang, M. Y., Feng, Y., Wang, L. F., Xiao, X., Eaton, B. T., Broder, C. C., and Dimitrov, D. S.** (2006). Potent neutralization of Hendra and Nipah viruses by human monoclonal antibodies. *J Virol* **80**(2), 891-9.
- Zuckerman, J. N.** (2000). The importance of injecting vaccines into muscle. Different patients need different needle sizes. *Bmj* **321**(7271), 1237-8.

Les vecteurs AAV recombinants : un nouvel outil de vaccination contre les Hénipavirus

Les virus Hendra (HeV) et Nipah (NiV) sont des virus émergents appartenant à la famille des Paramyxovirus et au genre des Hénipavirus. Chaque année, ils sont responsables de nombreuses épidémies touchant plusieurs espèces animales dont les hommes, avec une forte morbidité et mortalité. À ce jour, aucun vaccin ni traitement ne sont commercialisés. Ce projet porte sur le développement d'un vaccin génétique pour lutter contre une infection par les Hénipavirus. La stratégie suivie, repose sur l'injection *in vivo* de vecteurs recombinants dérivés du virus Adéno-Associé (AAVr) codant pour la glycoprotéine d'enveloppe G du virus NiV. Une première expérience réalisée chez la souris, a montré qu'une seule injection de vecteurs AAVr par voie IM permet le développement d'une réponse humorale contre la protéine G, forte et stable dans le temps. Afin de tester le pouvoir protecteur de ce vaccin, des hamsters ont été infectés par les Hénipavirus, compte tenu de leur grande sensibilité à ces infections. L'injection de vecteurs AAVr chez ces animaux a permis de protéger 100 % des animaux infectés par le virus NiV et 50 % des animaux infectés par le virus HeV. Cette étude apporte une nouvelle approche de vaccination et de nouvelles perspectives concernant l'utilisation des vecteurs AAVr pour lutter contre des infections virales émergentes.

Mots clés : Hénipavirus, vaccination, vecteur AAV, anticorps neutralisants, glycoprotéine G